

## (12) NACH DEM VERTRAG VON VENEDIG DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESEN (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
29. Januar 2004 (29.01.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2004/009806 A1**(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 9/02

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/007590

(22) Internationales Anmeldedatum:  
14. Juli 2003 (14.07.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 32 778.5 18. Juli 2002 (18.07.2002) DE(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE];  
. 67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): REINDL, Andreas  
[DE/DE]; Brunhildestr. 24, 68199 Mannheim (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; 67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: NADH-DEPENDENT CYTOCHROME B5 REDUCTASE AS A TARGET FOR HERBICIDES

(54) Bezeichnung: NADH-ABHÄNGIGE CYTOCHROM B5 REDUKTASE ALS TARGET FÜR HERBIZIDE

**(57) Abstract:** The invention relates to the use of a polypeptide with the biological activity of an NADH-dependent cytochrome b5 reductase (E.C. 1.6.2.2), which when absent causes growth retardation and chlorotic foliage and is coded by the nucleic acid sequence SEQ ID NO:1 or functional equivalents of the aforementioned nucleic acid sequence, as a target for herbicides. Within this scope, functional equivalents of SEQ ID NO:1 are provided. The invention also relates to the use of the polypeptide with the biological activity of an NADH-dependent cytochrome b5 reductase in a method for identifying compounds with a herbicidal action, which inhibit NADH-dependent cytochrome b5 reductase. The invention further relates to the use of the compounds, which have been identified by the method, as herbicides.

**(57) Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung eines Polypeptides mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase (E.C. 1.6.2.2), welches bei Nichtanwesenheit Wachstumsretardierungen sowie chlorotische Blätter bedingt, und durch die Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 oder funktionelle Äquivalente der vorstehend genannten Nukleinsäuresequenz codiert wird, als Target für Herbizide. In diesem Rahmen werden funktionelle Äquivalente der SEQ ID NO:1 bereitgestellt. Weiterhin umfasst die vorliegende Erfindung die Verwendung des Polypeptides mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase in einem Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider Wirkung, welche NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase inhibieren. Des weiteren betrifft die Erfindung die Verwendung dieser über das Verfahren identifizierten Verbindungen als Herbizide.

WO 2004/009806 A1

## NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase als Target für Herbizide

### Beschreibung

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung eines Polypeptides mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase (E.C. 1.6.2.2), welches bei Nichtanwesenheit Wachstumsretardierungen sowie chlorotische Blätter bedingt, und durch die Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 oder funktionelle Äquivalente der vorstehend genannten Nukleinsäuresequenz codiert wird, als Target für Herbizide.
- 10 In diesem Rahmen werden funktionelle Äquivalente der SEQ ID NO:1 bereitgestellt. Weiterhin umfasst die vorliegende Erfindung die Verwendung des Polypeptides mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase in einem Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider Wirkung, welche NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase inhibieren. Des weiteren betrifft die Erfindung die
- 15 Verwendung dieser über das Verfahren identifizierten Verbindungen als Herbizide.

Das grundlegende Prinzip, Herbizide über Inhibition eines definierten Targets zu identifizieren ist bekannt (z.Bsp. US 5,187071, WO 98/33925, WO 00/77185). Generell besteht ein großer Bedarf, Enzyme zu detektieren, welche neue Targets für Herbizide darstellen könnten. Gründe hierfür sind auftretende Resistenzproblematiken von an bereits bekannten Targets wirkenden herbiziden Wirkstoffen und das ständige Bemühen neue herbizide Wirkstoffe zu identifizieren, die sich durch einen möglichst breiten Wirkungsbereich, ökologische und toxikologische Verträglichkeit und/oder geringe Aufwandmengen auszeichnen.

25 Die Detektion von neuen Targets ist in der Praxis mit großen Schwierigkeiten verbunden, da die Hemmung eines Enzyms, das Bestandteil eines Stoffwechselweges ist, häufig das Wachstum der Pflanze nicht weiter beeinflusst. Dies kann daran liegen, dass die Pflanze auf alternative Stoffwechselwege ausweicht, deren Existenz nicht bekannt ist, oder dass das inhibierte Enzym nicht limitierend für den Stoffwechselweg ist. Ferner zeichnen sich pflanzliche Genome durch eine große funktionelle Redundanz aus. Im Genom von *Arabidopsis thaliana* liegen funktional äquivalente Enzyme im Vergleich zu Insekten oder Säugern häufiger in Genfamilien vor (Nature, 2000, 408(6814):796-815). Diese Annahme wird experimentell bestätigt durch die Tatsache, dass grosse Gen-Knock-out-Programme durch T-DNA- oder Transposoninsertion in *Arabidopsis* bisher weniger ausgeprägte Phänotypen lieferten als erwartet (Curr. Op. Plant Biol. 4, 2001, pp.111-117).

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht daher darin, neue Targets zu identifizieren, die für das Wachstum von Pflanzen essentiell sind bzw. deren Inhibition für

die Pflanze zu einem verminderten Wachstum führen, sowie Verfahren bereitzustellen, welche zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider Wirkung geeignet sind.

Die Aufgabe wurde gelöst durch die Verwendung eines Polypeptides mit der biologi-

- 5 schen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase kodiert durch eine Nukleinsäuresequenz bestehend aus

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz;
- 10 b) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lässt;
- 15 c) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:2, das eine Identität mit der SEQ ID NO:2 von mindestens 39% aufweist, ableiten lässt; oder
- 20 d) einem funktionellen Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 52% zu der SEQ ID NO:1.

als Target für Herbizide.

- 25 An dieser Stelle werden nun weitere der in der Beschreibung verwendeten Begriffe definiert.

“Affinitäts-Tag”: Bezeichnet ein Peptid oder Polypeptid, dessen kodierende Nukleinsäuresequenz mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz direkt oder mittels eines

- 30 Linkers über gängige Klonierungstechniken fusioniert werden kann. Das Affinitäts-Tag dient zur Isolierung, Anreicherung und/oder gezielten Aufreinigung des rekombinanten Zielproteins mittels Affinitäts-Chromatographie aus Gesamtzellextrakten. Der oben erwähnte Linker kann vorteilhaft eine Protease-Schnittstelle (z.B. für Thrombin oder Faktor Xa) enthalten, wodurch das Affinitäts-Tag bei Bedarf vom Zielprotein abgespalten werden kann. Beispiele für gängige Affinitäts-Tags sind das "His-Tag" z.B. von Quiagen, Hilden, "Strep-Tag", das "Myc-Tag" (Invitrogen, Carlsberg), das aus einer Chitin bindenden Domäne und einem Intein bestehende Tag von New England Biolabs, das Maltose-bindende Protein (pMal) von New England Biolabs und das sogenannte CBD-Tag von Novagen. Der Affinitäts-Tag kann dabei am 5'- oder 3'-Ende der

kodierenden Nukleinsäuresequenz mit der für das Zielprotein kodierenden Sequenz angebracht sein.

5

“Erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz”: Dieser Begriff wird weiter unten definiert.

“Expressionskassette”: Eine Expressionskassette enthält eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpft mit mindestens einem genetischen Kontrollelement, wie einem Promotor, sowie vorteilhaft mit einem weiteren Kontrollelement, wie einem Terminator. Die Nukleinsäuresequenz der Expressionskassette kann beispielsweise eine genomische oder eine komplementäre DNA-Sequenz oder eine RNA-Sequenz sowie halb- oder vollsynthetische Analoga davon sein. Diese Sequenzen können in linearer oder zirkulärer Form, extra-chromosomal oder integriert in das Genom vorliegen. Die entsprechenden Nukleinsäuresequenzen können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen werden oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Gennabschnitten verschiedener Organismen bestehen.

20 Auch artifizielle Nukleinsäuresequenzen sind hierbei geeignet, solange sie die Expression eines durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz kodierten Polypeptides mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase in einer Zelle oder einem Organismus ermöglichen. Beispielsweise können synthetische Nukleotid-Sequenzen erzeugt werden, die bezüglich der Kodon-Nutzung des von den zu transformierenden Organismen optimiert wurden.

Alle vorstehend erwähnten Nukleotid-Sequenzen sind in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragment-Kondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleotidbausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise in bekannter Weise nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente so manipuliert werden, dass eine Nukleotid-Sequenz mit korrekter Leserichtung und korrektem Leseraster erhalten wird. Die Verbindung der Nukleinsäure-Fragmente untereinander erfolgt über allgemeine Klonierungstechniken wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, “Experiments with Gene Fusions”, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor,

NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1994) beschrieben sind.

- "Funktionelle Verknüpfung": Unter einer funktionellen oder operativen Verknüpfung  
5 versteht man die sequenzielle Anordnung regulativer Sequenzen bzw. genetischer Kontrollelemente derart, daß jede der regulativen Sequenzen bzw. jedes der genetischen Kontrollelemente ihre Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.
- 10 "Funktionelle Äquivalente" beschreiben hier Nukleinsäuresequenzen, die unter Standardbedingungen mit der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 oder Teilen der SEQ ID NO:1 hybridisieren und befähigt sind, die Expression eines Polypeptides mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase in einer Zelle oder einem Organismus zu bewirken.
- 15 Zur Hybrisierung werden vorteilhaft kurze Oligonukleotide mit einer Länge von etwa 10-50 bp, vorzugsweise 15-40 bp beispielsweise der konservierten oder sonstigen Bereiche, die über Vergleiche mit anderen verwandten Genen in dem Fachmann bekannter Weise ermittelt werden können, verwendet. Es können aber auch längere Fragmente  
20 der erfindungsgemäß Nukleinsäuren mit einer Länge von 100-500 bp oder die vollständigen Sequenzen für die Hybridisierung verwendet werden. Je nach der verwendeten Nukleinsäure/Oligonukleotid, der Länge des Fragmentes oder der vollständige Sequenz oder je nachdem welche Nukleinsäureart, d.h. DNA oder RNA, für die Hybridisierung verwendet werden, variieren diese Standardbedingungen. So liegen beispiels-  
25 weise die Schmelztemperaturen für DNA:DNA-Hybride ca 10°C niedriger als die von DNA:RNA-Hybridien gleicher Länge.
- Unter Standardhybridisierungsbedingungen sind beispielsweise je nach Nukleinsäure Temperaturen zwischen 42 und 58°C in einer wäßrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 bis 5 x SSC (1 X SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,2) oder zusätzlich in Gegenwart von 50 % Formamid wie beispielsweise 42°C in 5 x SSC, 50 % Formamid zu verstehen. Vorteilhafterweise liegen die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 20°C bis 65°C, bevorzugt zwischen etwa 30°C bis 45°C. Für DNA:RNA-Hybride liegen  
30 die Hybridisierungsbedingungen vorteilhaft bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 30°C bis 65°C, bevorzugt zwischen etwa 45°C bis 55°C. Diese angegebenen Temperaturen für die Hybridisierung sind beispielhaft kalkulierte Schmelztemperaturwerte für eine Nukleinsäure mit einer Länge von ca. 100 Nukleotiden und einem G + C-Gehalt von 50 % in Abwesenheit von Formamid. Die experimentellen Bedingungen  
35 für die DNA-Hybridisierung sind in einschlägigen Lehrbüchern der Genetik, wie bei-  
40

- spielsweise Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, beschrieben und lassen sich nach dem Fachmann bekannten Formeln beispielweise abhängig von der Länge der Nukleinsäuren, der Art der Hybride oder dem G + C-Gehalt berechnen. Weitere Informationen zur Hybridisierung kann der Fachmann folgenden Lehrbüchern entnehmen: Ausubel et al. (eds), 1985, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York; Hames and Higgins (eds), 1985, "Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, Essential Molecular Biology: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.
- Unter einem funktionellen Äquivalent der SEQ ID NO:1 versteht man weiterhin auch Nukleinsäuresequenzen die mit der SEQ ID NO:1 bis zu einem definierten Prozentsatz homolog bzw. identisch sind und ferner insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen der vorstehend genannten Nukleinsäuresequenzen, die für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase kodieren.
- Es werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfasst, welche man durch Modifikation der vorstehend genannten Nukleinsäuresequenzen erhält. Beispielhaft können solche Modifikationen durch dem Fachmann geläufige Techniken, wie "Site Directed Mutagenesis", "Error Prone PCR", "DNA-shuffling" (Nature 370, 1994, pp.389-391) oder "Staggered Extension Process" (Nature Biotechnol. 16, 1998, pp.258-261) erzeugt werden. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die Einfügung weiterer Restriktionsenzymeschnittstellen, die Entfernung von DNA zur Verkürzung der Sequenz, der Austausch von Nukleotiden zur Codon-Optimierung oder das Hinzufügen weiterer Sequenzen sein. Proteine, die über modifizierte Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, müssen trotz abweichender Nukleinsäuresequenz noch die gewünschten Funktionen besitzen.
- Der Begriff des funktionellen Äquivalents kann sich auch auf das durch die entsprechende Nukleinsäuresequenz kodierte Aminosäuresequenz beziehen. In diesem Fall beschreibt der Begriff funktionelles Äquivalent ein Protein, dessen Aminosäuresequenz mit der SEQ ID NO:2 bis zu einem definierten Prozentsatz identisch bzw. homolog ist.
- Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltenen, an den Kodon-Gebrauch adaptierte Nukleinsäuresequenzen bzw. die davon abgeleiteten Aminosäuresequenzen.

“Genetische Kontrollsequenz” beschreibt Sequenzen, die einen Einfluss auf die Transkription und gegebenenfalls Translation der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren in prokaryotischen oder eukaryontischen Organismen haben. Beispiele hierfür sind Promotoren, Terminatoren oder sogenannte “enhancer” Sequenzen. Zusätzlich zu diesen

- 5 Kontrollsequenzen oder anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch so modifiziert worden sein, dass die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression des Zielgens modifiziert, also erhöht oder erniedrigt wurde.

10 Die Auswahl der Kontrollsequenz erfolgt abhängig vom Wirtsorganismus oder Ausgangsorganismus. Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Region, Introns oder die nichtkodierende 3'-Region von Genen. Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom erlauben. Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, Promotorelemente oder Minimalpromotoren, sowie die Chromatinstruktur beeinflussende Sequenzen (z.B. Matrix attachment regions (MAR's)) die die expressionssteuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebespezifische Expression zusätzlich abhängig von bestimmten Stressfaktoren erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wasserstress, Abscisinsäure (Lam E und Chua NH, J Biol Chem 1991; 266(26): 17131 -17135), Kälte- und Trockenstress (Plant Cell 1994, (6): 251-264) und Hitestress (Molecular & General Genetics, 1989, 217(2-3): 246-53) beschrieben.

“Homologie” zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen oder Polypeptidsequenzen wird durch die Identität der Nukleinsäuresequenz/Polypeptidsequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge der kürzeren der beiden Sequenzen definiert, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.2 Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin, USA) unter Einstellung folgender Parameter für Polypeptide

**Gap Weight:** 8      **Length Weight:** 2  
**Average Match:** 2,912      **Average Mismatch:**-2,003

und folgender Parameter für Nukleinsäuren

**Gap Weight:** 50      **Length Weight:** 3  
**Average Match:** 10.000      **Average Mismatch:** -0.000

berechnet wird.

Anstelle des Begriff "homolog" oder "Homologie" wird im Folgenden auch gleichbedeutend der Begriff Identität verwendet.

"Mutationen" von Nuklein- oder Aminosäuresequenzen umfassen Substitutionen

- 5 (=Ersetzungen), Additionen (Hinzufügung), Deletionen (Lösung), Inversion (Veränderungen) oder Insertionen (Einfügungen) eines oder mehrerer Nukleotidreste, wodurch sich auch die entsprechende Aminosäuresequenz des Zielproteins mittels Substitution, Insertion oder Deletion einer oder mehrerer Aminosäuren verändern kann, wobei jedoch insgesamt die funktionellen Eigenschaften des Zielproteins im wesentlichen beibehalten werden.

"Natürliche genetische Umgebung" meint den natürlichen chromosomal Locus in dem Herkunftsorganismus. Im Fall einer genomischen Bibliothek ist die natürliche genetische Umgebung der Nukleinsäuresequenz bevorzugt zumindest noch teilweise

- 15 erhalten. Die Umgebung flankiert die Nukleinsäuresequenz zumindest an 5'- oder 3'- Seite und hat eine Sequenzlänge von mindestens 50 bp, bevorzugt mindestens 100 bp, besonders bevorzugt mindestens 500 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, am meisten bevorzugt mindestens 5000 bp.

- 20 "Pflanzen" im Sinne der Erfindung sind Pflanzenzellen, -gewebe, -organe oder ganzen Pflanzen wie Samen, Knollen, Blüten, Pollen, Früchte, Sämlinge, Wurzeln, Blätter, Stengel oder sonstige Pflanzenteile zu verstehen. Außerdem ist unter Pflanzen Vermehrungsmaterial wie Samen, Früchte, Sämlinge, Stecklinge, Knollen, Schnitte oder Wurzelstücke zu verstehen.

"Reaktionszeit" bezeichnet die Zeit, die man für die Durchführung eines Aktivitätstests bis zum Erhalt einer signifikanten Aussage über eine Aktivität benötigt und hängt sowohl von der spezifischen Aktivität des im Test eingesetzten Proteins als auch von der 30 verwendeten Methode und der Empfindlichkeit der verwendeten Geräte ab. Dem Fachmann ist die Ermittlung der Reaktionszeiten bekannt. Bei auf photometrischen Methoden basierenden Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider Wirkung liegen die Reaktionszeiten beispielsweise im allgemeinen zwischen > 0 bis 120 Minuten.

- 35 "Rekombinante DNA" beschreibt eine Kombination von DNA-Sequenzen herstellbar durch rekombinante DNA-Technologie.

"Rekombinante DNA-Technologie": allgemein bekannte Techniken zur Fusionierung von DNA-Sequenzen (z.B. beschrieben in Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbour, NY, Cold Spring Harbour Laboratory Press).

- 5 "Replikationsursprünge" gewährleisten die Vermehrung der erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Vektoren in Mikroorganismen und Hefen z.B. der pBR322 ori oder der P15A ori in E. coli (Sambrook et al.: "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) und der ARS1 ori in Hefe (Nucleic Acids Research, 2000, 28(10): 2060-2068).
- 10 "Reportergene" kodieren für leicht quantifizierbare Proteine. Über Wachstums-, Fluoreszenz-, Chemo-, Biolumineszenz- oder Resistenzassay oder über eine photometrische Messung (Eigenfarbe) oder Enzymaktivität kann mittels dieser Gene eine Bewertung der Transformationseffizienz oder des Expressionsortes oder -zeitpunktes vorgenommen werden. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E, Groskreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie das "green fluorescence protein" (GFP) (Gerdes HH and Kaether C, FEBS Lett. 1996; 389(1):44-47; Chui WL et al., Curr Biol 1996, 6:325-330; Leffel SM et al., Biotechniques. 23(5):912-8, 1997), die Chloramphenicolacetyltransferase, eine Luziferase (Giacomin, Plant Sci 1996, 116:59-72; Scikantha, J Bact 1996, 178:121; Millar et al., Plant Mol Biol Rep 1992 10:324-414), sowie Luziferasegene, im allgemeinen die  $\beta$ -Galactosidase oder die  $\beta$ -Glucuronidase (Jefferson et al., EMBO J. 1987, 6, 3901-3907) oder das Ura3-Gen.
- 15 "Selektionsmarker" verleihen eine Resistenz gegen Antibiotika, oder andere toxische Verbindungen: Beispielhaft zu nennen seien hier das Neomycin-Phosphotransferase-Gen, das eine Resistenz gegen die Aminoglycosid-Antibiotika Neomycin (G 418), Kanamycin, Paromycin (Deshayes A et al., EMBO J. 4 (1985) 2731-2737), das sul Gen kodierend für eine mutierte Dihydropteroat Synthase (Guerineau F et al., Plant Mol Biol. 1990; 15(1):127-136), das Hygromycin B Phosphotransferase-Gen (Gen Bank Accession NO: K 01193) und das shble Resistenzgen, das eine Resistenz gegen die Bleomycin Antibiotika wie zB. Zeocin verleiht. Weitere Beispiele für Selektionsmarker-Gene sind Gene, die eine Resistenz gegen 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder Phosphinotricin etc. verleihen oder solche, die eine Antimetaboliten-Resistenz verleihen, zum Beispiel das dhfr-Gen (Reiss, Plant Physiol. (Life Sci. Adv.) 13 (1994) 142-149). Geeignet sind ferner Gene wie trpB oder hisD (Hartman SC and Mulligan RC, Proc Natl Acad Sci U S A. 85 (1988) 8047-8051). Geeignet ist auch das Gen der Mannose-Phosphat Isomerase (WO 94/20627), das ODC (Ornithin-Decarboxylase) Gen (McConlogue, 1987 in: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, Hrsg.) oder die Deaminase aus Aspergillus terreus (Tamura K et al., Biosci Biotechnol Biochem. 59 (1995) 2336-2338).

"Transformation" beschreibt einen Prozess zur Einführung heterologer DNA in eine pro- oder eukaryontische Zelle. Mit einer transformierten Zelle ist nicht nur das Produkt des Transformationsprozesses an sich beschrieben, sondern auch alle transgenen

5 Nachkommen des durch die Transformation hergestellten transgenen Organismus

"Target/Target Protein": ein Polypeptid codiert über die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, welches ein Enzym im klassischen Sinne sein kann oder z.B. ein Strukturprotein, ein für Entwicklungsprozesse relevantes Protein, Regulationsproteine wie

10 Transkriptionsfaktoren, Kinasen, Phosphatasen, Rezeptoren, Untereinheiten von Kanälen, Transportproteine, regulatorische Untereinheiten die einem Enzymkomplex eine Substrat- oder Aktivitätsregulation verleihen. Allen Targets oder Wirkorten gemein ist dabei, dass deren funktionale Anwesenheit essentiell für das Überleben oder die normale Entwicklung und das Wachstum sind.

15 "Transgen": Bezogen auf eine Nukleinsäuresequenz, eine Expressionskassette oder einen Vektor enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder einen Organismus transformiert mit der vorstehend genannten Nukleinsäuresequenz, Expressionskassette oder Vektor beschreibt der Ausdruck transgen alle solche durch gentechnische Methoden hergestellten Konstruktionen, in denen sich entweder die Nukleinsäuresequenz des Zielproteins oder eine mit der Nukleinsäuresequenz des Zielproteins funktionell verknüpfte genetische Kontrollsequenz oder eine Kombination der vorstehend genannten Möglichkeiten sich nicht in ihrer natürlichen genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden. Die Modifikation 20 kann hier beispielsweise über Mutation eines oder mehrerer Nukleotidreste der entsprechenden Nukleinsäuresequenz erreicht werden.

Die Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 codiert für eine spezifisch von NADH abhängige Cytochrom b5 Reduktase (E.C. 1.6.2.2).

30 Charakteristisch für höhere Eukaryoten ist das an der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisierte Elektronen-Transfersystem besteht aus einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase und Cytochrom b5 (Cytb5). Die NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase überträgt mit einem FAD als prosthetischer Gruppe dabei Elektronen von NADH auf Cytb5, ein Häm-haltiges Protein. Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase bezeichnet somit ein Enzym, welches in der Lage ist, mit einem FAD als prosthetischer Gruppe dabei Elektronen von NADH auf Cytb5, ein Häm-haltiges Protein, zu übertragen. Die enzymatische Aktivität eines Enzyms mit der biologischen Aktivität einer NADH- 35

abhängigen Cytochrom b5 Reduktase kann mittels geeigneter Aktivitätstests bestimmt werden, wie sie beispielhaft weiter unten beschrieben werden (s. u.a. auch Beispiel 5).

In Pflanzen wurde Cytb5 als Komponente des Elektronentransports bei der Modifikation von Fettsäuren beschrieben (Kearns et al, 1991; Spektrum Akademischer Verlag

Heidelberg, Berlin, Oxford, Seite 751). Vermutlich werden die Elektronen anschließend von Cytochrom b5 weiter auf Desaturasen oder P450 Monooxygenasen übertragen (Fukuchi-Mizutani, Plant Physiology, 119; 353-361; 1999). Pflanzliche NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktasen werden in nahezu allen Zelltypen gefunden, insbesondere in unreifen Samen (Fukuchi-Mizutani, Plant Physiology, 119; 353-361; 1999).

Erstmals isoliert und charakterisiert wurde die NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase aus menschlichen Erythrozyten (Yubisui T, Takeshita M., J Biol Chem.,

1980;255(6):2454-1456) und seitdem auch aus vielen anderen Organismen. Bekannt sind Nukleinsäuresequenzen pflanzlicher NADH-abhängiger Cytochrom b5 Reduktasen z.B. aus Arabidopsis (Gen Bank Acc. No. AB007799; Mizutani und Fukuchi-Mizutani, Plant Physiol. 119, 353-361; 1999) sowie ESTs pflanzlicher NADH-abhängiger Cytochrom b5 Reduktasen aus *Medicago truncatula* (Gen Bank Acc. No. AA660929; Covitz,P.A. et al. Plant Physiol. 117 (4), 1325-1332 (1998) Identität zur SEQ ID NO:1 = 68.763%, Identität mit SEQ ID NO:2 = 46,897%), *Oryza sativa* (Gen Bank Acc. No. BE039960; Identität zur SEQ ID NO:1 = 69.457%, Identität mit SEQ ID NO:2 = 75,912%), *Solanum tuberosum* (Gen Bank Acc. No. BE340917, Identität zur SEQ ID NO:1 = 75.564%, Identität mit SEQ ID NO:2 = 81,675%) und *Beta vulgaris* (Gen Bank Acc. No. BI096337; Identität zur SEQ ID NO:1 = 52.727%; Identität mit SEQ ID NO:2 = 39,552%) und Kürbis (*Cucurbita maxima*; Gen Bank Acc. No. AF274589; Identität mit SEQ ID NO:1=56.703%, Identität mit SEQ ID NO:2 =43.621%).

NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase aus menschlichen Erythrozyten kann durch millimolare Konzentrationen von Inositol Hexaphosphat gehemmt werden (Palmieri et al, Archives of Biochemistry and Biophysics, 1990, 280(1), 224-228). Thienoylfluoracetone zeigt bei 0.5 mM eine 50%ige Hemmung der NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase aus Rattenleber-Mikrosomen (Golf et al, Biol. Chem. Hoppe-Seyler 1985, 366, 647-653). Weitere Substanzen, die NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase aus verschiedenen Organismen hemmen können, sind Amytal, Mepacrin, Dicoumarol (Golf et al; 1985, Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 366, pp. 647-653), oder N-Ethylmaleimide und Atebrin (Tamura et al; 1983, J. Biochem. 94, pp. 1547-1555). Inhibitoren für pflanzliche NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktasen wurden jedoch bisher nicht beschrieben.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde überraschenderweise gefunden, dass Pflanzen, in denen gezielt die Aktivität der NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase verringert wurde, Phänotypen aufwiesen, die mit durch Herbizidapplikation erzeugten Phänotypen vergleichbar sind. Beobachtet wurden Wachstumsretardierungen und

- 5 nekrotische, gestresste Blätter sowie in einigen Fällen das Absterben ganzer Pflanzen oder von Pflanzenteilen. Die Schoten dieser Pflanzen waren entweder leer oder enthielten verkümmerte Samen, die allesamt nicht in der Lage waren, zu keimen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von einem Polypeptid mit  
10 der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase kodiert durch eine Nukleinsäuresequenz bestehend aus

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz;
- 15 b) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lässt;
- 20 c) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:2, das eine Identität mit der SEQ ID NO:2 von mindestens 39% aufweist, ableiten lässt; oder
- 25 d) einem funktionellen Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 52% zu der SEQ ID NO:1;

als Target für Herbicide. Die funktionellen Äquivalente gemäß c) zeichnen sich durch eine im wesentlichen gleiche Funktionalität aus, d.h. sie haben die physiologische  
30 Funktion einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase.

Die erfindungsgemäßen funktionellen Äquivalente der SEQ ID NO:1 weisen eine Homologie mit der SEQ ID No:1 von mindestens 52%, 53%, 54%, 55%, 56%,  
35 57%, 58%, 59% vorzugsweise mindestens 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69% und 70% bevorzugt mindestens 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76% besonders bevorzugt mindestens 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90% ganz besonders bevorzugt mindestens 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% auf.

- Die erfindungsgemäßen funktionellen Äquivalente der SEQ ID NO:2 weisen eine Homologie mit der SEQ ID No:2 von mindestens 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59% vorzugsweise mindestens 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69% und
- 5 70% bevorzugt mindestens 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86% besonders bevorzugt mindestens 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93% ganz besonders bevorzugt mindestens 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% auf.
- 10 Beispiele für funktionelle Äquivalente sind die bereits oben erwähnten für NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase codierenden pflanzlichen Nukleinsäuresequenzen oder Aminosäuresequenzen einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase aus *Medicago truncatula* (Gen Bank Acc. No. AA660929; Covitz,P.A. et al. Plant Physiol. 117 (4), 1325-1332 (1998)), *Oryza sativa* (Gen Bank Acc. No. BE039960), *Solanum tuberosum* (Gen Bank Acc. No. BE340917), *Beta vulgaris* (Gen Bank Acc. No. BI096337) und Kürbis (*Cucurbita maxima*; Gen Bank Acc. No. AF274589).
- 15 Weiterhin werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung funktionelle Äquivalente der vorstehend genannten Nukleinsäuresequenzen beansprucht, die für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase kodieren, enthaltend einen Teilbereich umfassend:
- 20 a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:3 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
- 25 b) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:4 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lässt; oder
- 30 c) funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3 mit einer Identität von mindestens 77% zu der SEQ ID NO:3.
- 35 d) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:4, das eine Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 87% aufweist, ableiten lässt.

Ebenfalls beansprucht werden die durch die vorstehend genannten Nukleinsäuresequenzen kodierten Polypeptide. Die funktionelle Äquivalente zeichnen sich durch eine

im wesentlichen gleiche Funktionalität aus, d.h. sie haben die physiologische Funktion einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase.

- Der Begriff "umfassend" oder "umfassen" bezogen auf Nukleinsäuresequenzen meint,
- 5    daß die erfindungsgemäß Nukleinsäuresequenz am 3' oder am 5' Ende zusätzliche Nukleinsäuresequenzen enthalten kann, wobei die Länge der zusätzlichen Nukleinsäuresequenzen 75bp am 5' und 50bp 3' Ende der erfindungsgemäß Nukleinsäuresequenzen, vorzugsweise 50bp am 5' und 10bp am 3' Ende nicht überschreitet.
- 10   Die erfindungsgemäß funktionellen Äquivalente der SEQ ID NO:3 weisen eine Homologie mit der SEQ ID No:3 von mindestens 77%, 78%, 79%, 80% bevorzugt mindestens 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90% besonders bevorzugt mindestens 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% auf.
- 15   Die erfindungsgemäß funktionellen Äquivalente der SEQ ID NO:4 weisen eine Homologie mit der SEQ ID No:4 von mindestens 87% vorzugsweise mindestens 88%, 89%, 89% bevorzugt mindestens 90%, 91%, 92%, 93% besonders bevorzugt mindestens 94%, 95%, 96% ganz besonders bevorzugt mindestens 97%, 98%, 99% auf.
- 20   Nukleinsäuresequenzen kodierend für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase bestehend aus
- 25     a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
- b) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder
- 30     c) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:2, das eine Identität mit der SEQ ID NO:2 von mindestens 39% aufweist, ableiten läßt; oder
- 35     d) einem funktionellen Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 52% zu der SEQ ID NO:1; oder
- 40   Nukleinsäuresequenzen kodierend für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase enthaltend einen Teilbereich umfassend:

- a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:3 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
- 5      b) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:4 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder
- 10     c) funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3 mit einer Identität von mindestens 86% zu der SEQ ID NO:3; oder
- 15     d) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:4, das eine Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 87% aufweist, ableiten läßt;

werden im folgenden als "erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen" bezeichnet. Die durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz kodierten Polypeptide mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase werden im folgenden der Einfachheit halber als "NCR" bezeichnet.

NCR verursachen in reduzierter Menge Wachstumsretardierungen sowie nekrotische Blätter in Pflanzen. Eine Reduktion des Polypeptides bedeutet, daß die Menge des Polypeptides über gentechnische Methoden reduziert wird. Verglichen wird eine derartig modifizierte Pflanze mit einer Pflanze, die bezüglich dieses Polypeptides keine genetischen Modifikationen aufweist, ansonsten aber mit dem Genotyp der genetisch manipulierten Pflanze identisch ist unter identischen Wachstumsbedingungen.

Die Genprodukte der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren stellen neue Targets für Herbizide dar, welche die Bereitstellung neuer Herbizide zur Bekämpfung unerwünschter Pflanzen ermöglichen.

Unter unerwünschten Pflanzen sind im weitesten Sinne alle Pflanzen zu verstehen, die an Orten aufwachsen, an denen sie unerwünscht sind, zum Beispiel:

35     Dikotyle Unkräuter der Gattungen: *Sinapis*, *Lepidium*, *Galium*, *Stellaria*, *Matricaria*, *Anthemis*, *Galinsoga*, *Chenopodium*, *Urtica*, *Senecio*, *Amaranthus*, *Portulaca*, *Xanthium*, *Convolvulus*, *Ipomoea*, *Polygonum*, *Sesbania*, *Ambrosia*, *Cirsium*, *Carduus*, *Sonchus*, *Solanum*, *Rorippa*, *Rotala*, *Lindernia*, *Lamium*, *Veronica*, *Abutilon*, *Emex*,  
40     *Datura*, *Viola*, *Galeopsis*, *Papaver*, *Centaurea*, *Trifolium*, *Ranunculus*, *Taraxacum*.

Monokotyle Unkräuter der Gattungen: *Echinochloa*, *Setaria*, *Panicum*, *Digitaria*,  
5 *Phleum*, *Poa*, *Festuca*, *Eleusine*, *Brachiaria*, *Lolium*, *Bromus*, *Avena*, *Cyperus*, *Sorghum*,  
*Agropyron*, *Cynodon*, *Monochoria*, *Fimbristylis*, *Sagittaria*, *Eleocharis*, *Scirpus*,  
*Paspalum*, *Ischaemum*, *Sphenoclea*, *Dactyloctenium*, *Agrostis*, *Alopecurus*, *Apera*.

Die SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:3 oder Teile der vorstehend genannten Nukleinsäuresequenzen können für die Herstellung von Hybridisierungssonden verwendet werden, über welche z.B. die entsprechenden Vollängengene und/oder funktionelle Äquivalente der SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:3 isoliert werden können. Die Herstellung dieser Sonden sowie die Durchführung der Experimente ist bekannt. Sie kann zum Beispiel über die gezielte Herstellung radioaktiver oder nicht radioaktiver Sonden mittels PCR und der Verwendung von entsprechend markierten Oligonukleotiden mit anschließenden Hybridisierungsexperimenten erfolgen. Die hierfür erforderlichen Technologien sind beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) aufgeführt. Die entsprechenden Sonden können weiterhin mittels Standardtechnologien (Lit. SDM bzw. random Mutagenesis) so modifiziert werden, dass sie für weitere Zwecke eingesetzt werden können, z.B. als Sonde, die spezifisch zu mRNA  
10 sowie den entsprechenden codierenden Sequenzen hybridisiert zwecks Analyse der entsprechenden Sequenzen in anderen Organismen.

Des weiteren können die oben genannten Sonden für die Detektion und Isolation von funktionellen Äquivalenten der SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:3 aus anderen Pflanzenspezies aufgrund von Sequenzidentitäten verwendet werden. Hierbei wird ein Teil oder die gesamte Sequenz der entsprechenden SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:3 als Sonde zum Screening in einer genomischen oder cDNA Bank der entsprechenden Pflanzenspezies oder in einer Computer-Recherche nach Sequenzen funktioneller Äquivalente in elektronischen Datenbanken verwendet.  
25

Bevorzugte Pflanzenspezies sind hierbei die bereits eingangs erwähnten unerwünschten Pflanzen.  
30

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Expressionskassetten enthaltend  
35  
a) genetische Kontrollsequenzen in funktioneller Verknüpfung mit einer Nukleinsäuresequenz umfassend einen Teilbereich enthaltend eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:3 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:4 dargestellten Aminosäuresequenz ab-  
40

- leiten läßt; oder funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3 mit einer Identität von mindestens 86% zu der SEQ ID NO:3; eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:4, das eine Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 87% aufweist, ableiten läßt;
- 5 b) zusätzliche Funktionselemente; oder
- 10 c) eine Kombination aus a) und b);
- sowie die Verwendung von Expressionskassetten enthaltend
- 15 a) genetische Kontrollsequenzen in funktioneller Verknüpfung mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz;
- b) zusätzliche Funktionselemente; oder
- 20 c) eine Kombination aus a) und b);
- zur Expression einer NCR, die in "in vitro" Testsystemen verwendet werden kann. Beide Ausführungsformen der vorstehend beschriebenen Expressionskassetten werden im folgenden als erfindungsgemäße Expressionskassette bezeichnet.
- 25 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine erfindungsgemäße Expressionskassette am 5'-Ende der kodierenden Sequenz einen Promotor und am 3'-Ende Transkriptions-Terminations-Signal und gegebenenfalls weitere genetische Kontrollsequenzen, welche mit der dazwischenliegenden erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpft sind.
- 30 Unter den erfindungsgemäßen Expressionskassetten sind auch Analoga zu verstehen, die zum Beispiel durch eine Kombination der einzelnen Nukleinsäuresequenzen auf einem Polynukleotid (Mehrfachkonstrukte), auf mehreren Polynukleotiden in einer Zelle (Kotransformation) oder durch sequenzielle Transformation zustande kommen können.
- 35 Vorteilhafte genetische Kontrollsequenzen nach Punkt a) für die erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder für Vektoren enthaltend erfindungsgemäße Expressionskassetten sind beispielsweise Promotoren wie cos-, tac-, trp-, tet-, lpp-, lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, λ-PR- oder im λ-PL-Promotor, die zur Expression der
- 40 NCR in gram-negativen Bakterienstämmen verwendet werden können.

Weitere vorteilhafte genetische Kontrollsequenzen sind beispielsweise in den Promotoren amy und SPO2, die zur Expression der NCR in gram-positiven Bakterienstämmen verwendet werden können, sowie in den Hefe- oder Pilzpromotoren AUG1, GPD-1,  
5 PX6, TEF, CUP1, PGK, GAP1, TPI, PHO5, AOX1, GAL10/CYC1, CYC1, OliC, ADH, TDH, Kex2, MFa oder NMT oder Kombinationen der vorstehend genannten Promotoren (Degryse et al., Yeast 1995 Jun 15; 11(7):629-40; Romanos et al. Yeast 1992 Jun;8(6):423-88; Benito et al. Eur. J. Plant Pathol. 104, 207-220 (1998); Cregg et al. Biotechnology (N Y) 1993 Aug;11(8):905-10; Luo X., Gene 1995 Sep 22;163(1):127-  
10 31; Nacken et al., Gene 1996 Oct 10;175(1-2): 253-60; Turgeon et al., Mol Cell Biol 1987 Sep;7(9):3297-305) oder den Transkriptionsterminatoren NMT, Gcy1, TrpC, AOX1, nos, PGK oder CYC1 (Degryse et al., Yeast 1995 Jun 15; 11(7):629-40; Brunelli et al. Yeast 1993 Dec;9(12): 1309-18; Frisch et al., Plant Mol. Biol. 27 (2), 405-409 (1995); Scorer et al., Biotechnology (N.Y.) 12 (2), 181-184 (1994), Genbank acc. number Z46232; Zhao et al. Genbank acc number : AF049064; Punt et al., (1987) Gene 56  
15 (1), 117-124) enthalten, die zur Expression der NCR in Hefestämmen verwendet werden können.

Als zur Expression in Insektenzellen geeignete genetische Kontrollsequenzen sind exemplarisch der Polyhedrin-Promotor sowie der p10-Promotor (Luckow, V.A. and Summers, M.D. (1988) Bio/Techn. 6, 47-55) zu nennen.  
20

Vorteilhafte genetische Kontrollsequenzen zur Expression der NCR in Zellkultur sind  
sind neben Polyadenylierungssequenzen wie z.B. aus Simian Virus 40 eukaryontische  
25 Promotoren viralen Ursprungs wie z.B. Promotoren des Polyoma, Adenovirus 2, Cytomegalovirus oder Simian Virus 40.

Weitere vorteilhafte genetische Kontrollsequenzen zur Expression der NCR in Pflanzen sind in den Pflanzenpromotoren CaMV/35S [Franck et al., Cell 21(1980) 285-294],  
30 PRP1 [Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993)], SSU, OCS, LEB4, USP, STLS1, B33, NOS; FBPaseP (WO 98/18940) oder im Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor enthalten, vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt sind Promotoren viralen Ursprungs wie der Promotor des 35S-Transkriptes des Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285-294; Odell et al., Nature 313 (1985), 810-812). Weitere bevorzugte konstitutive Promotoren sind zum Beispiel der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al., Plant Mol Biol 1995, 29:637-649), die Promotoren der vakuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991).  
35  
40

Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor als genetische Kontrollsequenz enthalten, durch den die Expression des exogenen Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salicylsäure induzierbarer (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer (EP-A-0388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können ebenfalls verwendet werden.

Geeignet sind ferner Promotoren die eine gewebe- oder organspezifische Expression z.B. in Antheren, Ovarien, Blüten und Blütenorganen, Blättern, Schließzellen, Trichomen, Stengel, Leitgeweben, Wurzeln und Samen vermitteln. Ebenfalls geeignet sind hier neben den oben genannten konstitutiven Promotoren, insbesondere solche Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445 - 245). Bevorzugt sind ferner Promotoren, die eine Expression in Samen und pflanzlichen Embryonen steuern. Samenspezifische Promotoren sind zum Beispiel der Promotor des Phaseolins (US 5,504,200, Bustos MM et al., Plant Cell. 1989;1(9):839-53), des 2S Albuminogens (Joseffson LG et al., J Biol Chem 1987, 262:12196-12201), des Legumins (Shirsat A et al., Mol Gen Genet. 1989;215(2):326-331), des USP (unknown seed protein; Bäumlein H et al., Molecular & General Genetics 1991, 225(3):459-67) des Napin Gens (Stalberg K, et al., L. Planta 1996, 199:515-519), des Saccharosebindeproteins (WO 00/26388) oder der LeB4-Promotor (Bäumlein H et al., Mol Gen Genet 1991, 225: 121-128; Fiedler, U. et al., Biotechnology (NY) (1995), 13 (10) 1090).

Weitere als genetische Kontrollsequenzen geeignete Promotoren sind beispielsweise spezifische Promotoren für Knollen, Speicherwurzeln oder Wurzeln, wie beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33), der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel, der Promotor der Stärke Synthase (GBSS1) oder der Sporamin Promotor, fruchtspezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtspezifische Promotor aus Tomate (EP-A 409625), fruchtreifung-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794), blüten spezifische Promotoren, wie beispielsweise der Phytoen Synthase Promotor (WO 92/16635) oder der Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593) oder spezifische Plastiden- oder Chromoplasten-Promotoren, wie beispielsweise der RNA-Polymerase Promotor (WO 97/06250) oder auch der Promotor der Phosphoribosylpyrophosphat Amidotransferase

aus Glycine max (siehe auch Genbank Accession Nr U87999) oder ein anderer Nodien-spezifischer Promotor wie in EP-A 249676 können vorteilhaft verwendet werden.

Unter zusätzlichen Funktionselementen b) sind beispielhaft aber nicht einschränkend

- 5 Reportergene, Replikationsursprünge, Selektionsmarker und sogenannte Affinitäts-Tags, fusioniert mit der NCR direkt oder mittels eines Linkers optional enthaltend eine Protease-Schnittstelle zu verstehen. Weitere geeignete zusätzliche Funktionselemente sind Sequenzen, die ein Targeting in den Apoplasten, in Plastiden, die Vakuole, das Mitochondrium, das Peroxisom, das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein  
10 Fehlen entsprechender operativer Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285-423).

Erfindungsgemäß sind ferner Vektoren, die mindestens eine Kopie der erfindungsgemäß

- 15 Nukleinsäuresequenzen und/oder der erfindungsgemäß Expressionskassetten enthalten.

Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Viren wie SV40, CMV, Baculovirus, Adenovirus,

- 20 Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Phagemide, Cosmide, lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden bevorzugt ist eine chromosomal Replikation.

In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann die erfindungsgemäß Nuk-

- 25 leinsäurekonstrukt auch vorteilhafterweise in Form einer linearen DNA in die Organismen eingeführt werden und über heterologe oder homologe Rekombination in das Genom des Wirtsorganismus integriert werden. Diese lineare DNA kann aus einem linearisierten Plasmid oder nur aus dem Nukleinsäurekonstrukt als Vektor oder den ver-wendeten Nukleinsäuresequenzen bestehen.

- 30 Weitere prokaryotische und eukaryotische Expressionssysteme sind genannt in Kapitel 16 und 17 in Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989. Weitere vorteilhafte Vektoren werden in Hellens et al. (Trends in plant science, 5, 2000) beschrieben.  
35

Die erfindungsgemäß Expressionskassette sowie davon abgeleitete Vektoren können zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen und eukaryontischen, nicht humanen Zellen (z.B. Insektenzellen) mit dem Ziel

- 40 der rekombinanten Herstellung der NCR eingesetzt werden, wobei sich die Herstellung

einer geeigneten Expressionskassette nach dem Organismus, in welchen das Gen exprimiert werden soll, richtet.

- In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform können die im erfindungsgemäßen  
5 Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen auch alleine in einen Organismus eingebracht werden.

- Sollen neben den Nukleinsäuresequenzen weitere Gene in den Organismus eingeführt werden, so können alle zusammen in einem einzigen Vektor oder jedes einzelne Gen  
10 10 in je einem Vektor in den Organismus eingebracht werden, wobei die verschiedenen Vektoren gleichzeitig oder sukzessive eingebracht werden können.

- Hierbei kann das Einbringen der erfindungsgemäßen Nukleinsäure(n), der Expressionskassette oder des Vektors in die entsprechenden Organismen (Transformation)  
15 prinzipiell nach allen dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen.

- Für Mikroorganismen kann der Fachmann entsprechende Methoden den Lehrbüchern von Sambrook, J. et al. (1989) "Molecular cloning: A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, von F.M. Ausubel et al. (1994) "Current protocols in molecular biology", John Wiley and Sons, von D.M. Glover et al., DNA Cloning Vol.1, (1995), IRL Press (ISBN 019-963476-9), von Kaiser et al. (1994) Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Habor Laboratory Press oder Guthrie et al. "Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology", Methods in Enzymology, 1994, Academic Press entnehmen.  
20

- 25 Für dikotyle Pflanzen können die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt werden. Geeignete Methoden sind das biolistische Verfahrens oder durch Protoplastentransformation (vergl. z.B. Willmitzer, L., 1993 Transgenic plants. In: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, eds.), Vol. 2, 627-659, VCH Weinheim-New York-Basel-Cambridge), die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 sowie in Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec.Biol. 42 (1991) 205-225) beschrieben.  
30  
35

- 40 Die Transformation mittels Agrobakterien sowie die für die Transformation zu verwendenden Vektoren sind dem Fachmann bekannt und in der Literatur ausführlich beschrieben (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711. Die intermediären Vektoren

können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige vir-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines

- 5 Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in *E.coli* als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen Linker oder Polylinker, welche von der rechten und linken T-DNA Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (; Holsters et al. Mol. Gen. 10 Genet. 163 (1978), 181-187) , EP A 0 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V., Albllasserdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant. Sci., 4: 1-46 und An et al. EMBO J. 4 (1985), 277-287).

Auch die Transformation monokotyler Pflanzen mittels *Agrobacterium* basierender Vektoren wurde beschrieben ( Chan et al, Plant Mol. Biol. 22(1993), 491-506; Hiei et al, Plant J. 6 (1994) 271-282; Deng et al; Science in China 33 (1990), 28-34; Wilmink et al, Plant Cell Reports 11,(1992) 76-80; May et al; Biotechnology 13 (1995) 486-492; Conner und Domisse; Int. J. Plant Sci. 153 (1992) 550-555; Ritchie et al; Transgenic Res. (1993) 252-265). Alternative Systeme zur Transformation von monokotylen Pflanzen

- 20 sind die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes (Wan und Lemaux; Plant Physiol. 104 (1994), 37-48; Vasil et al; Biotechnology 11 (1992), 667-674; Ritala et al, Plant Mol. Biol 24, (1994) 317-325; Spencer et al, Theor. Appl. Genet. 79 (1990), 625-631) die Protoplastentransformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen ; die Einbringung von DNA mittels Glasfasern. Insbesondere die Transformation 25 von Mais wurde in der Literatur mehrfach beschrieben (vgl. z.B. WO 95/06128; EP 0513849 A1; EP 0465875 A1; EP 0292435 A1; Fromm et al, Biotechnology 8 (1990), 833-844; Gordon-Kamm et al, Plant Cell 2 (1990), 603-618; Koziel et al, Biotechnology 11(1993) 194-200; Moroc et al, Theor Applied Genetics 80 (190) 721-726). Bei der Transformation von filamentösen Pilzen bieten sich zum einen die Herstellung von Protoplasmata und Transformation mit Hilfe von PEG (Wiebe et al. (1997) Mycol. Res. 101 (7): 971-877; Proctor et al. (1997) Microbiol. 143, 2538-2591), zum anderen die Transformation unter zur Hilfe nahme von *Agrobacterium tumefaciens* (de Groot et al. (1998) Nat. Biotech. 16, 839-842) an.

- 35 Auch die erfolgreiche Transformation anderer Getreidearten wurde bereits beschrieben z.B. für Gerste ( Wan und Lemaux, s.o.; Ritala et al, s.o.; Weizen ( Nehra et al, Plant J. 5(1994) 285-297).

- Mit einem erfindungsgemäßen Vektor transformierte Agrobakterien können ebenfalls in 40 bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen wie Testpflanzen wie *Arabidopsis*

oder Kulturpflanzen wie Getreide, Mais, Hafer, Roggen, Gerste, Weizen, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Karotte, Paprika, Raps, Tapioka, Maniok, Pfeilwurz, Tagetes, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Die genetisch veränderten Pflanzenzellen können über alle dem Fachmann bekannten Methoden regeneriert werden. Entsprechende Methoden können den oben genannten 10 Schriften von S.D. Kung und R. Wu, Potrykus oder Höfgen und Willmitzer entnommen werden.

Die durch Transformation mit einer der oben beschriebenen Ausführungsformen einer Expressionskassette, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder 15 einem Vektor, enthaltend die vorstehend genannte Expressionskassette, hergestellten transgenen Organismen sowie die mittels Expression aus dem transgenen Organismus erhältliche rekombinante NCR sind Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von transgenen Organismen 20 enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionskassette z.B. für die Bereitstellung rekombinanter Proteins und/oder die Verwendung dieser Organismen in in vivo Testsystemen.

Bevorzugte Organismen für die rekombinante Expression sind neben Bakterien, Hefen, Moose, Algen, Pilze auch eukaryontische Zelllinien.

25 Bevorzugte Moose sind *Physcomitrella patens* oder weitere in Kryptogamen, Bd.2, Moose, Farne, 1991, Springer Verlag (ISBN 3540536515), beschriebene Moose.

Innerhalb der Bakterien sind Bakterien der Gattung *Escherichia*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, 30 *Alcaligenes* oder *Cyanobakterien* zum Beispiel der Gattung *Synechocystis* oder *Anabena* bevorzugt.

Bevorzugte Hefen sind *Candida*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula* oder *Pichia*.

35 Bevorzugte Pilze sind *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Beauveria*, *Mortierella*, *Saprolegnia*, *Pythium*, oder weitere in Indian Chem Engr. Section B. Vol 37, No 1,2 (1995) beschriebene Pilze.

Bevorzugte Pflanzen sind insbesondere ausgewählt unter monokotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel Getreidearten wie Weizen, Gerste, Hirse, Roggen, Triticale, Mais, Reis oder Hafer sowie dem Zuckerrohr. Ferner sind die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen insbesondere ausgewählt unter dikotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel Brassicaceae wie Raps, Kresse, Arabidopsis, Kohlarten oder Canola; Legumino-sae wie Soja, Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen oder Erdnuss Solanaceae wie Kartof-fel, Tabak, Tomate, Aubergine oder Paprika; Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes, Salat oder Calendula; Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini, oder Lein, Baumwolle, Hanf, Flachs, Roter Pfeffer, Möhre, Karotte, Zuckerrübe oder verschiedene 5 Baums-, Nuss- und Weinspecies.

- Prinzipiell sind als Wirtsorganismen auch transgene Tiere geeignet wie beispielsweise *C. elegans*.
- 15 Bevorzugt ist auch die Verwendung von Expressionssystemen und Vektoren, die öffent-lich zugänglich oder kommerziell erhältlich sind.
- Zur Verwendung in *E. coli* Bakterien sind die typischen vorteilhaften, kommerziell er-hältlichen Fusions- und Expressionsvektoren pGEX [Pharmacia Biotech Inc; Smith, 20 D.B. and Johnson, K.S. (1988) Gene 67:31-40], pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) and pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) welches Glutathion S-transferase bein-haltet (GST), Maltose Bindepotein, oder Protein A, die pTrc-Vektoren (Amann et al., (1988) Gene 69:301-315) der "pKK233-2" von CLONTECH, Palo Alto, CA und die "pET"-, und die "pBAD"-Vektor-Serien von Stratagene, La Jolla zu nennen.
- 25 Weitere vorteilhafte Vektoren zur Verwendung in Hefe sind pYEpSec1 (Baldari, et al., (1987) Embo J. 6:229-234), pMFA (Kurjan and Herskowitz, (1982) Cell 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al., (1987) Gene 54:113-123), and pYES-Derivate, pGAPZ-Derivate, pPICZ-Derivate sowie die Vektoren des "Pichia Expression Kit" (Invitrogen 30 Corporation, San Diego, CA). Vektoren für die Nutzung in filamentösen Pilzen sind beschrieben in: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: Applied Molecular Genetics of Fungi, J.F. Peberdy, et al., eds., p. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.
- 35 Alternativ können auch vorteilhaft Insektenzellexpressionsvektoren genutzt werden z.B. für die Expression in Sf9, Sf21 oder Hi5 Zellen, welche über rekombinante Baculoviren infiziert werden. Dies sind z.B. die Vektoren der pAc Serie (Smith et al. (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) und der pVL series (Lucklow and Summers (1989) Virology 170:31-39). Weiterhin genannt seien die Baculovirus Expressionssysteme "MaxBac 2.0 Kit" 40 und "Insect Select System" von Invitrogen, Calsbald oder "BacPAK Baculovirus Ex-

pressionssystem" von CLONTECH, Palo Alto, CA. Insektenzellen eignen sich in besonderer Weise zur Überexpression eukaryontischer Proteine, da sie posttranskriptionale Modifikationen der Proteine durchführen, die in Bakterien und Hefen nicht möglich sind. Die Handhabung von Insektenzellen in Zellkultur sowie ihre Infektion zur Expression von Proteinen sind dem Fachmann bekannt und können in Analogie zu bekannten Methoden erfolgen (Luckow und Summers, Bio/Tech. 6, 1988, pp.47-55; Glover and Hames (eds) in DNA Cloning 2, A practical Approach, Expression Systems, Second Edition, Oxford University Press, 1995, 205-244).

Des weiteren können zur Genexpression vorteilhaft Pflanzenzellen oder Algenzellen genutzt werden. Beispiele für Pflanzenexpressionsvektoren finden sich wie obenstehend erwähnt in Becker, D., et al. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", Plant Mol. Biol. 20: 1195-1197 oder in Bevan, M.W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", Nucl. Acid. Res. 12: 8711-8721.

Weiterhin können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen in Säugerzellen exprimiert werden. Beispiel für entsprechende Expressionsvektoren sind pCDM8 und pMT2PC genannt in: Seed, B. (1987) Nature 329:840 oder Kaufman et al. (1987) EMBO J. 6:187-195). Dabei sind vorzugsweise zu nutzende Promotoren viralen Ursprungs wie z.B. Promotoren des Polyoma, Adenovirus 2, Cytomegalovirus oder Simian Virus 40. Weitere prokaryotische und eukaryotische Expressionssysteme sind genannt in Kapitel 16 und 17 in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989. Weitere vorteilhafte Vektoren werden in Hellens et al. (Trends in plant science, 5, 2000) beschrieben.

Die mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette transformierten Organismen werden unter dem Begriff "erfindungsgemäßer transgener Organismus" bezeichnet.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von NCR in einem Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider Wirkung.

Bevorzugt umfasst das erfindungsgemäße Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider Wirkung die folgenden Schritte:

- i. Inkontaktbringen einer NCR mit einer oder mehreren Testverbindungen unter Bedingungen, die die Bindung der Testverbindung(en) an die NCR erlauben; und

- ii. Nachweis, ob die Testverbindung an die NCR aus i) bindet; oder
  - iii. Nachweis, ob die Testverbindung die Aktivität der NCR aus i) reduziert oder blockiert; oder
- 5
- iv. Nachweis, ob die Testverbindung die Transkription, Translation oder Expression der NCR aus i) reduziert oder blockiert.

Der Nachweis gemäß Schritt (ii) des oben stehenden Verfahrens kann anhand von  
10 Techniken, welche die Wechselwirkung zwischen Protein und Ligand aufzeigen, erfolgen. Hierbei kann entweder die Testverbindung oder das Enzym eine detektierbare Markierung enthalten, wie z.B. eine fluoreszierende, radioisotope, chemilumineszirende oder enzymatische Markierung. Beispiele für enzymatische Markierungen sind Meerrettich Peroxidase, alkalische Phosphatase oder Luziferasen. Die anschließende  
15 Detektion richtet sich nach der Markierung und ist dem Fachmann bekannt.

Hierbei sind insbesondere fünf bevorzugte Ausführungsformen zu nennen, die im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung auch für Hochdurchsatzmethoden (High Throughput Screening, HTS) geeignet sind:

- 20
- 1. Über Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 11753-11575) lässt sich die durchschnittliche Diffusionsrate eines Fluoreszenzmoleküls in Abhängigkeit zur Masse in einem kleinen Probenvolumen bestimmen. Durch Messen der Massenänderung bzw. der daraus resultierenden veränderten Diffusionsrate einer Testverbindung beim Binden an die NCR lässt sich FCS zur Bestimmung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen einsetzen. Ein erfindungsgemäßes Verfahren kann direkt zur Messung der Bindung einer durch ein Fluoreszenzmolekül markierten Testverbindung aufgebaut werden. Alternativ kann das erfindungsgemäßes Verfahren so konzipiert sein, dass eine durch ein Fluoreszenzmolekül markierte chemische Referenzverbindung durch weitere Testverbindungen verdrängt wird ("Verdrängungsassay"). Die so identifizierten Verbindungen können als Inhibitoren geeignet sein.

25

  - 2. Die Fluoreszenzpolarisation nutzt die Eigenschaft eines mit polarisiertem Licht angeregten ruhenden Fluorophors ebenfalls wieder polarisiertes Licht zu emittieren. Kann der Fluorophor allerdings während des angeregten Zustands rotieren, so geht die Polarisation des emittierten Fluoreszenzlichts mehr oder weniger verloren. Bei sonst gleichen Bedingungen (z.B. Temperatur, Viskosität, Lösungsmittel) ist die Rotation eine Funktion der Molekülgröße, womit man über das Messsignal eine Aussage über die Größe des am Fluorophor gebundenen Rests trifft.

30

35

40

fen kann (Methods in Enzymology 246 (1995), pp. 283-300). Ein erfindungsgemäßes Verfahren kann direkt zur Messung der Bindung einer durch ein Fluoreszenzmolekül markierten Testverbindung an die NCR aufgebaut werden. Alternativ kann das erfindungsgemäße Verfahren auch in Form des unter 1 beschriebenen "Verdrängungsassays" konzipiert sein. Die so identifizierten Verbindungen können als Inhibitoren geeignet sein.

3. Fluoreszenz-Resonanz Energie Transfer" (FRET) basiert auf der strahlungslosen Energieübertragung zwischen zwei räumlich benachbarten Fluoreszenzmolekülen unter geeigneten Bedingungen. Eine Voraussetzung ist die Überlappung des Emissionsspektrums des Donormoleküls mit dem Anregungsspektrum des Akzeptormoleküls. Durch Fluoreszenzmarkierung der NCR und den auf Bindung Tetsverbindung kann mittels FRET die Bindung gemessen werden (Cytometry 34, 1998, pp. 159-179). Alternativ kann das erfindungsgemäße Verfahren auch in Form des unter 1 beschriebenen "Verdrängungsassays" konzipiert sein. Eine besonders geeignete Ausführungsform der FRET Technologie ist die "Homogenous Time Resolved Fluorescence" (HTRF), wie sie von Packard BioScience vertrieben wird. Die so identifizierten Verbindungen können als Inhibitoren geeignet sein.
4. Surface Enhanced-Laser Desorption/Ionisation (SELDI) in Kombination mit einem "Time of Flight" Massenspektrometer (MALDI-TOF) ermöglicht die schnelle Analyse von Molekülen auf einem Träger und kann zur Analyse von Protein-Ligand Wechselwirkungen verwendet werden (Worral et al., (1998) Anal. Biochem. 70:750-756). In einer bevorzugten Ausführungsform immobilisiert man nun die NCR auf einem geeigneten Träger und inkubiert diesen mit der Testverbindung. Nach einem oder mehreren geeigneten Waschschritten kann man die an die NCR zusätzlich gebundenen Moleküle der Testverbindung mittels der oben erwähnten Methodik detektieren und somit Inhibitoren selektieren. Die so identifizierten Verbindungen können als Inhibitoren geeignet sein.
5. Die Messung von Oberflächen Plasmonenresonanz basiert auf der Änderung des Brechnungsindexes an einer Oberfläche beim Binden einer Testverbindung an ein auf besagter Oberfläche immobilisierten Protein. Da die Änderung des Brechungsindex für eine definierte Änderung der Massenkonzentration an der Oberfläche quasi für alle Proteine und Polypeptide identisch ist, kann diese Methode prinzipiell auf jedes Protein angewendet werden (Lindberg et al. Sensor Actuators 4 (1983) 299-304; Malmquist Nature 361 (1993) 186-187). Die Messung kann beispielsweise mit Hilfe der von Biacore (Freiburg) vertriebenen auf Oberflächen-Plasmonenresonanz basierenden Analyseautomaten in einem Durchsatz

von derzeit bis zu 384 Proben pro Tag durchgeführt werden. Ein erfindungsgemäßes Verfahren kann direkt zur Messung der Bindung einer Testverbindung an die NCR aufgebaut werden. Alternativ kann das erfindungsgemäße Verfahren auch in Form des unter 1 beschriebenen "Verdrängungsassays" konzipiert sein.

5 Die so identifizierten Verbindungen können als Inhibitoren geeignet sein.

Sämtliche, über die oben genannten Verfahren identifizierten Substanzen können anschließend in einer anderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens auf ihre herbizide Wirkung überprüft werden.

- 10 Auch besteht die Möglichkeit, über Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der NCR mittels Röntgenstrukturanalyse weitere potentielle herbizide Wirkstoffe mittels "Molecular Modelling" zu detektieren. Die Herstellung von für die Röntgenstrukturanalyse benötigten Proteinkristallen sowie die entsprechenden Messungen und anschließenden 15 Auswertungen dieser Messungen, die Detektion einer Bindungstelle im Protein sowie die Vorhersage möglicher Inhibitorstrukturen sind dem Fachmann bekannt. Über "Molecular Modelling" ist prinzipiell auch eine Optimierung der über die oben genannten Verfahren identifizierten Verbindungen möglich.
- 20 Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, das auf den Schritten i) und ii) basiert, besteht darin, daß
- i. eine NCR in einem erfindungsgemäßen, transgenen Organismus exprimiert wird oder ein Organismus, der naturgemäß eine NCR enthält, kultiviert wird;
  - 25 ii. die NCR aus Schritt i) im Zellaufschluss des transgenen bzw. nicht transgenen Organismus, in partiell gereinigter Form oder in zur Homogenität gereinigten Form mit einer Testverbindung in Kontakt gebracht wird; und
- 30 iii. eine Verbindung selektiert wird, welche die Aktivität der NCR reduziert oder blockiert, wobei die Aktivität der mit der Testverbindung inkubierten NCR mit der Aktivität einer nicht mit einer Testverbindung inkubierten NCR ermittelt wird.
- 35 Die NCR enthaltende Lösung kann aus dem Lysat des ursprünglichen Organismus oder des transgenen, mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette transformierten Organismus bestehen. Falls erforderlich kann die NCR partiell oder vollständig über gängige Methoden aufgereinigen werden. Eine allgemeine Übersicht über gängige Techniken zur Reinigung von Proteinen sind beispielsweise in Ausubel, F.M. et al.,
- 40 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-

- Interscience (1994); ISBN 0-87969-309-6 beschrieben. Bei rekombinanter Darstellung kann eine Reinigung des mit einem Affinitäts-Tag fusionierten Proteins über nach dem Fachmann bekannten Affinitätschromatographie erfolgen. Die Aufreinigung der NCR aus menschlichem Gewebe kann beispielsweise nach dem Verfahren von Jollie et al.
- 5 (Plant Physiol. 85, pp. 457-462, 1987) erfolgen.

Die für in vitro Verfahren benötigte NCR kann somit entweder mittels heterologer Expression aus einem erfindungsgemäßen, transgenen Organismus oder aus einem Organismus, der eine NCR Aktivität enthält, isoliert werden, vorzugsweise aus einer unerwünschten Pflanze, wobei unter dem Begriff der unerwünschten Pflanze die ein-

10 gang erwähnten Spezies zu verstehen sind.

Zur Identifizierung von herbiziden Verbindungen wird nun die NCR mit einer Testverbindung inkubiert. Nach einer Reaktionszeit wird die Aktivität der mit der Testverbindung inkubierten NCR mit der Aktivität einer nicht mit einer Testverbindung inkubierten NCR ermittelt. Bei Inhibition der NCR beobachtet man eine signifikante Abnahme der Aktivität im Vergleich zur Aktivität des nicht inhibierten erfindungsgemäßen Polypeptides, wobei eine Abnahme von mindestens 10%, vorteilhaft mindestens 20%, bevorzugt mindestens 30%, besonders bevorzugt um mindestens 50% bis hin zu einer 100%

15 Reduktion (Blockierung) erzielt wird. Bevorzugt mindestens 50% Hemmung bei Konzentrationen der Testverbindung von  $10^{-4}$  M, bevorzugt bei  $10^{-5}$  M, besonders bevorzugt von  $10^{-6}$  M bezogen auf Enzymkonzentration im mikromolaren Bereich.

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der NCR kann beispielsweise über einen Aktivitätstest erfolgen, in welchem die Zunahme des Produktes, die Abnahme des Substrates (oder Eduktes) oder die Abnahme eines spezifischen Cofaktors oder über eine Kombination aus mindestens zwei der vorstehend genannten Parameter in Abhängigkeit einer definierten Zeitspanne bestimmt werden.

25

30 Beispiele für geeignete Substrate sind z.B. Ferricytochrom b5, Kalium-Ferricyanid, 2,6-Dichlorphenolindophenol, Methemerythrin, p-Benzoquinon oder 5-Hydroxy-1,4-Naphtoquinon bevorzugt Ferricytochrom b5, Kalium-Ferricyanid, 2,6-Dichlorphenolindophenol besonders bevorzugt Ferricytochrom b5, Kalium-Ferricyanid ganz besonders bevorzugt Kalium-Ferricyanid und für geeignete Cofaktoren NADH.

35 Gegebenenfalls können auch Derivate der vorstehend genannten Verbindungen verwendet werden, die eine detektierbare Markierung enthalten, wie z.B. eine fluoreszierende, radioisotope oder chemilumineszierende Markierung.

Die für den Aktivitätstest einzusetzenden Mengen an Substrat liegen zwischen 0.5-10 mM und Mengen an NADH zwischen 0.1-5 mM bezogen auf 1-100 µg/ml Enzym.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird der Umsatz eines Substrates

5 photometrisch verfolgt, angelehnt an ein von Mihara und Sato (Methods Enzymol., 52, 1978, pp. 102-108) beschriebenes Verfahren, welches auf der Reduktion von Kalium-Ferricyanid und der photometrische Messung bei 420 nm basiert.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, das auf den

10 Schritten i) und iii) basiert, besteht aus den folgenden Schritten:

- i. Herstellung eines erfindungsgemäßen transgenen Organismus;
- ii. Aufbringen einer Testverbindung auf den transgenen Organismus nach i) und auf  
15 einen nicht-transgenen Organismus des gleichen Genotyps;
- iii. Bestimmen des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit des transgenen und  
des nicht transgenen Organismus nach der Aufbringung der Testverbindung; und
- iv. Selektion von Testverbindungen, die ein verminderter Wachstum oder eingeschränkte Überlebensfähigkeit des nicht-transgenen Organismus bewirken verglichen mit dem Wachstum des transgenen Organismus bewirken.

In diesem Verfahren wird in dem transgenen Organismus gemäß i) das Polypeptid mit

25 der biologischen Aktivität einer NCR überexprimiert. Der transgene Organismus weist somit gegenüber einer nicht-transgenen Organismus eine erhöhte NCR-Aktivität auf, wobei unter erhöhter NCR-Aktivität des transgenen Organismus eine gegenüber dem nicht transgenen Organismus der gleichen Gattung um mindestens 10% , bevorzugt um mindestens 25%, besonders bevorzugt um mindestens 40%, ganz besonders bevorzugt um mindestens 50% höhere Aktivität zu verstehen ist.

Hierbei beträgt der Wachstumsunterschied der in Schritt iv) zur Selektion eines Inhibitors mit herbizider Wirkung mindestens 10%, vorzugsweise 20%, bevorzugt 30%, besonders bevorzugt 40% und ganz besonders bevorzugt 50%.

35 Der transgene Organismus ist hierbei ein Bakterium, eine Hefe, ein Pilz, eine Pflanze oder eine eukaryontische Zelllinie (aus Insekten oder Säugetieren wie z.B. Maus), bevorzugt Pflanzen, Bakterien oder Hefen, die sich mittels gängiger Techniken leicht transformieren lassen, wie *Arabidopsis thaliana*, *Solanum tuberosum*, *Nicotiana Tabacum* oder *Saccharomyces cerevisiae* in welchen die für ein erfindungsgemäße Poly-

- peptid kodierende Sequenz über Transformation inkorporiert wurde. Diese transgenen Organismen weisen daher eine erhöhte Toleranz gegen Verbindungen auf, welche das erfindungsgemäße Polypeptid inhibieren. *Saccharomyces cerevisiae* bietet sich hier insbesondere an, weil ihr Genom vollständig sequenziert ist und sie leicht zur Herstellung von "knock-out"-Mutanten verwendet werden kann und das in diesem Organismus vorhandene analoge NCR-Gen gezielt ausgeschaltet werden kann (z.B. Methods in Yeast Genetics, Kaiser, Michaelis, Mitchell (eds.) CSHL Press, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994: 73-85).
- 5 Die vorstehend genannte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann jedoch auch zur Identifizierung von Verbindungen mit wachstumsregulatorischer Wirkung verwendet werden. Hierbei wird als transgener Organismus eine Pflanze eingesetzt. Das Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit wachstumsregulatorischer Wirkung umfasst somit die folgenden Schritte:
- 10 i. Herstellung einer transgenen Pflanze enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NCR;
- 15 ii. Aufbringen einer Testsubstanz auf die transgene Pflanze nach i) und auf eine nicht-transgene Pflanze der gleichen Sorte;
- 20 iii. Bestimmen des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der transgenen und der nicht transgenen Pflanze nach dem Aufbringen der Testsubstanz; und
- 25 iv. Selektion von Testsubstanzen, die ein verändertes Wachstum der nicht-transgenen Pflanze bewirken verglichen mit dem Wachstum der transgenen Pflanze.
- In diesem Verfahren wird in der transgenen Pflanze gemäß i) das Polypeptid mit der 30 biologischen Aktivität einer NCR überexprimiert. Die transgene Pflanze weist somit gegenüber einer nicht-transgenen Pflanze der gleichen Gattung eine erhöhte NCR-Aktivität auf, wobei unter erhöhter NCR-Aktivität der transgenen Pflanze eine gegenüber einer nicht transgenen Pflanze der gleichen Gattung eine um mindestens 10%, bevorzugt um mindestens 25%, besonders bevorzugt um mindestens 40%, ganz besonders bevorzugt um mindestens 50% höhere Aktivität zu verstehen ist.
- 35 Hierbei werden in Schritt iv) Testverbindungen selektiert, die ein verändertes Wachstum des nicht-transgenen Organismus bewirken verglichen mit dem Wachstum des transgenen Organismus bewirken. Unter verändertem Wachstum ist hierbei eine Hemmung des vegetativen Wachstums der Pflanzen zu verstehen, was sich insbesondere in einer Reduzierung des Längenwachstums äußern kann. Die behandelten
- 40

Pflanzen weisen demgemäß einen gedrungenen Wuchs auf; außerdem ist eine dunkle-  
re Blattfärbung zu beobachten. Weiterhin ist unter verändertem Wachstum auch eine  
zeitliche Veränderung des Reifeverlaufs, eine Heummung oder Vermehrungen seitli-  
cher Verzweigungen der Pflanzen, eine Verkürzung bzw. Verlängerung der Entwick-  
5 lungenstadien, eine Erhöhung der Standfestigkeit, das Wachstum größerer Mengen an  
Knospen, Blüten, Blättern, Früchten, Samenkörnern, Wurzeln und Knollen, eine Erhö-  
hung des Zuckergehaltes in Pflanzen wie Zuckerrüben, Zuckerrohr sowie Zitrusfrüch-  
ten, des Proteingehaltes in Pflanzen wie Getreide oder Soja oder eine Stimulierung des  
10 Latexfluß an Gummibäumen zu verstehen. Die Detektion dieses veränderten Wachs-  
tums ist dem Fachmann bekannt.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren können auch mehrere Testverbindungen in  
einem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden. Wenn durch eine Gruppe von  
15 Testverbindungen eine Beeinflussung des Targets erfolgt, dann ist es entweder mög-  
lich, die einzelnen Testverbindungen direkt zu isolieren oder die Gruppe von Testver-  
bindungen in verschiedene Untergruppen zu teilen, z.B. wenn sie aus einer Vielzahl  
von verschiedenen Komponenten besteht, um so die Zahl der verschiedenen Testver-  
bindungen im erfindungsgemäßen Verfahren zu reduzieren. Das erfindungsgemäße  
20 Verfahren wiederholt man dann mit der einzelnen Testverbindung oder der entspre-  
chenden Untergruppe von Testverbindungen. Abhängig von der Komplexität der Probe  
können die oben beschriebenen Schritte mehrmals wiederholt werden, vorzugsweise  
bis die gemäß der erfindungsgemäßen Methode identifizierte Untergruppe nur noch  
eine geringe Anzahl von Testverbindungen oder nur noch eine Testverbindung umfaßt.  
25 Alle oben beschriebenen Verfahren für die Identifizierung von Inhibitoren mit herbizider  
Wirkung werden im folgenden als "erfindungsgemäße Verfahren" bezeichnet.

Sämtliche, über die erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten Verbindungen oder  
Substanzen können anschließend auf ihre herbizide Wirkung *in vivo* überprüft werden.  
30 Eine Möglichkeit zur Prüfung der Verbindungen auf herbizide Wirkung ist die Verwen-  
dung der Wasserlinse *Lemna minor* in Mikrotiterplatten. Als Parameter können Verän-  
derungen des Chlorophyllgehalts und die Photosyntheseleistung gemessen werden.  
Es ist auch möglich, die Verbindung auf unerwünschte Pflanzen direkt zu applizieren,  
wobei die herbizide Wirkung z.B. über eingeschränktes Wachstum festgestellt werden  
35 kann.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch vorteilhaft in Hochdurchsatzverfahren,  
sog. HTS durchgeführt werden, welches das parallele Testen einer Vielzahl verschie-  
dener Verbindungen ermöglicht.

Im HTS bietet sich für die praktische Durchführung die Verwendung von Trägern an, die eines oder mehrere der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle, einen oder mehrere die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz enthaltenden Vektoren, einen oder mehrere transgene Organismen, welche mindestens eine der erfindungsgemäßen

5 Nukleinsäuresequenzen enthalten oder eines oder mehrere (Poly)peptide codiert über die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthalten. Der verwendete Träger kann fest oder flüssig sein, ist bevorzugt fest, besonders bevorzugt eine Mikrotiterplatte. Die vorstehend genannten Träger sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Gemäß der am weit verbreitesten Technik werden 96-well, 384-well und 1536

10 well Mikrotiterplatten verwendet, die in der Regel Volumina von 200 µl umfassen können. Neben den Mikrotiterplatten sind die weiteren Bestandteile eines HTS-Systems passend zu den entsprechenden Mikrotiterplatten wie viele Instrumente, Materialien, automatische Pipettierzubereitungen, Robotoren, automatisierte Plattenleser sowie Plattenwascher kommerziell erhältlich.

15 Neben den auf Mikrotiterplatten basierenden HTS-Verfahren können auch sogenannte "free format assays" oder Testsysteme, die zwischen den Proben keine physischen Barrieren aufweisen, verwendet werden wie z.B. in Jayaickreme et al., Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 19 (1994) 161418; Chelsky, "Strategies for Screening Combinatorial

20 Libraries, First Annual Conference of The Society for Biomolecular Screening in Philadelphia, Pa. (Nov. 710, 1995); Salmon et al., Molecular Diversity 2 (1996), 5763 und US 5,976,813.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen mit herbizider Wirkung identifiziert nach den erfindungsgemäßen Verfahren. Diese Verbindungen werden im folgenden "selektierte Verbindungen" genannt. Sie weisen ein Molekulargewicht von kleiner als 1000 g/mol, vorteilhaft kleiner 500 g/mol, bevorzugt kleiner 400 g/mol, besonders bevorzugt kleiner 300 g/mol. Verbindungen mit herbizider Wirkung weisen einem Ki-Wert kleiner 1 mM, bevorzugt kleiner 1 µM, besonders bevorzugt kleiner 0,1 µM

25 ganz besonders bevorzugt kleiner 0,01 µM aufweisen.

30 Die selektierte Verbindungen können natürlich auch in Form ihrer landwirtschaft brauchbaren Salze vorliegen. Unter landwirtschaftlich brauchbaren Salzen kommen vor allem die Salze derjenigen Kationen oder die Säureadditionssalze derjenigen Säuren in Betracht, deren Kationen beziehungsweise Anionen die herbizide Wirkung der selektierten Verbindungen nicht negativ beeinträchtigen.

35 Ferner können die selektierte Verbindungen sofern sie asymmetrisch substituierte α-Kohlenstoffatome enthalten, entweder als Racemate, Enantiomerengemische, reine

Enantiomere oder, sofern sie chirale Substituenten aufweisen, auch als Diastereomerengemische vorliegen.

Die selektierten Verbindungen können chemisch synthetisierte oder mikrobiologisch

- 5 produzierte Stoffe sein und z.B. in Zellextrakten von z.B. Pflanzen, Tieren oder Mikroorganismen auftreten. Das Reaktionsgemisch kann ein zellfreier Extrakt sein oder eine Zelle oder Zellkultur umfassen. Geeignete Methoden sind dem Fachmann bekannt und werden z.B. allgemein beschrieben in Alberts, Molecular Biology the cell, 3<sup>rd</sup> Edition (1994), z.B. Kapitel 17. Die selektierte Verbindungen können auch aus umfangreichen  
10 Substanzbibliotheken stammen.

Mögliche Testverbindungen können Expressionsbibliotheken wie z.B. cDNA-Expressionsbibliotheken, Peptide, Proteine, Nukleinsäuren, Antikörper, kleine organische Stoffe, Hormone, PNAs oder ähnliches sein (Milner, Nature Medicin 1 (1995),

- 15 879–880; Hupp, Cell. 83 (1995), 237–245; Gibbs, Cell. 79 (1994), 193–198 und darin zitierte Referenzen).

Die selektierte Verbindungen können zur Bekämpfung von unerwünschtem Pflanzenwuchs, unter Umständen auch zur Defoliation, beispielsweise von Kartoffeln, oder De-

- 20 sikkation, beispielsweise von Baumwolle, sowie als Wachstumsregulatoren verwendet werden. Herbizide Zusammensetzungen, welche die selektierten Verbindungen enthalten, bekämpfen Pflanzenwuchs auf Nichtkulturflächen sehr gut. In Kulturen wie Weizen, Reis, Mais, Soja und Baumwolle wirken sie gegen Unkräuter und Schadgräser, ohne die Kulturpflanzen nennenswert zu schädigen. Dieser Effekt tritt vor allem bei  
25 niedrigen Aufwandmengen auf. Die selektierten Verbindungen können zur Bekämpfung der oben bereits erwähnten Schadpflanzen verwendet werden.

In Abhängigkeit von der jeweiligen Applikationsmethode können selektierten Verbin-

- 30 dungen bzw. diese enthaltende herbizide Zusammensetzungen vorteilhaft noch in einer weiteren Zahl von Kulturpflanzen zur Beseitigung unerwünschter Pflanzen eingesetzt werden. In Betracht kommen beispielsweise folgende Kulturen:

Allium cepa, Ananas comosus, Arachis hypogaea, Asparagus officinalis, Beta vulgaris spec. altissima, Beta vulgaris spec. rapa, Brassica napus var. napus, Brassica napus

- 35 var. napobrassica, Brassica rapa var. silvestris, Camellia sinensis, Carthamus tinctorius, Carya illinoiensis, Citrus limon, Citrus sinensis, Coffea arabica (Coffea canephora, Coffea liberica), Cucumis sativus, Cynodon dactylon, Daucus carota, Elaeis guineensis, Fragaria vesca, Glycine max, Gossypium hirsutum, (Gossypium arboreum, Gossypium herbaceum, Gossypium vitifolium), Helianthus annuus, Hevea brasiliensis, Hordeum vulgare, Humulus lupulus, Ipomoea batatas, Juglans regia, Lens culinaris, Linum

usitatissimum, Lycopersicon lycopersicum, Malus spec., Manihot esculenta, Medicago sativa, Musa spec., Nicotiana tabacum (N.rustica), Olea europaea, Oryza sativa, Phaseolus lunatus, Phaseolus vulgaris, Picea abies, Pinus spec., Pisum sativum, Prunus avium, Prunus persica, Pyrus communis, Ribes sylestre, Ricinus communis, Saccharum officinarum, Secale cereale, Solanum tuberosum, Sorghum bicolor (s. vulgare), Theobroma cacao, Trifolium pratense, Triticum aestivum, Triticum durum, Vicia faba, Vitis vinifera, Zea mays.

Darüber hinaus können die selektierten Verbindungen auch in Kulturen, die durch  
10 Züchtung einschließlich gentechnischer Methoden gegen die Wirkung von Herbiziden tolerant sind, verwandt werden. Die Herstellung dieser Kulturen wird weiter unten beschrieben.

Weiter Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung der oben bereits  
15 erwähnten herbiziden Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet dass man selektierten Verbindungen mit geeigneten Hilfsmitteln zu Pflanzenschutzmitteln formuliert.

Die selektierten Verbindungen können z.B. in Form von direkt versprühbaren wässrigen Lösungen, Pulvern, Suspensionen, auch hochprozentigen wäßrigen, ölichen oder  
20 sonstigen Suspensionen bzw. Suspoemulsionen oder Dispersionen, emulgierbaren Konzentraten, Emulsionen, Öldispersionen, Pasten, Stäubemitteln, Streumitteln oder Granulaten formuliert werden und durch Versprühen, Vernebeln, Verstäuben, Verstreuen oder Gießen angewendet werden. Die Anwendungsformen richten sich nach den Verwendungszwecken und der Natur der selektierten Verbindungen und sollte in jedem Fall möglichst die feinste Verteilung der selektierten Verbindungen gewährleisten. Die herbiziden Zusammensetzung enthalten eine herbizid wirksame Menge  
25 mindestens einer selektierten Verbindung und für die Formulierung von herbiziden Zusammensetzungen übliche Hilfsstoffe.

Zur Herstellung von Emulsionen, Pasten oder wässrigen oder ölhaltigen Formulierungen sowie dispergierbaren Konzentraten (DC) können die selektierten Verbindungen in einem Öl oder Lösungsmittel gelöst oder dispergiert werden, wobei weitere Formulierungshilfsstoffe zur Homogenisierung zugesetzt werden können. Es können aber auch aus selektierter Verbindung, gegebenenfalls Lösungsmitteln oder Öl sowie optional  
30 weiteren Hilfsmitteln bestehende flüssige oder feste Konzentrate hergestellt werden, die zur Verdünnung mit Wasser geeignet sind. Hierzu nennen sind emulgierbare Konzentrate (EC, EW), Suspensionen (SC), lösliche Konzentrate (SL), dispergierbaren Konzentrate (DC), Pasten, Pastillen netzbaren Pulvern oder Granulaten, wobei die festen Formulierungen entweder in Wasser löslich (soluble) oder dispergierbar (wettable) sein können. Des Weiteren können entsprechende Pulver bzw. Granulate oder  
35  
40

Tabletten noch mit einem festen, den Abrieb oder eine vorzeitige Wirkstofffreisetzung verhinderenden Überzug ("coating") versehen werden.

Prinzipiell sind unter dem Begriff "Hilfsmittel" folgende Verbindungsklassen zu verstehen:

- 5 Antischäumungsmittel, Verdicker, Netzmittel, Haftmittel, Dispergiermittel, Emulgiermittel, Bakterizide und/oder thixotrophe Agentien. Die Bedeutung der oben genannten Mittel ist dem Fachmann bekannt.

SLs, EWs und ECs können durch einfaches Mischen der entsprechenden Inhaltsstoffe

- 10 hergestellt werden, Pulver über Mischen oder Vermahlen in speziellen Mühlentypen (z.Bsp. Hammermühlen). DC, SCs und SEs werden üblicherweise über Naßvermahlung ("wet milling") hergestellt, wobei ein SE aus einem SC durch Zugabe einer organischen Phase, die weitere Hilfsmittel oder selektierte Verbindungen enthalten kann, hergestellt werden kann. Die Herstellung ist bekannt. Pulver-, Streu- und Stäubemittel

- 15 können vorteilhaft durch Mischen oder gemeinsames Vermahlen der wirksamen Verbindungen mit einem festen Trägerstoff hergestellt werden. Granulate, z.B. Umhüllungs-, Imprägnierungs- und Homogengranulate können durch Bindung der selektierten Verbindungen an feste Trägerstoffe hergestellt werden. Weitere Details der Herstellung sind dem Fachmann bekannt, und z.Bsp. in folgenden Schriften aufgeführt:

- 20 US 3,060,084, EP-A 707445 (für flüssige Konzentrate), Browning, "Agglomeration", Chemical Engineering, Dec. 4, 1967, 147-48, Perry's Chemical Engineer's Handbook, 4th Ed., McGraw-Hill, New York, 1963, pages 8-57 und ff. WO 91/13546, US 4,172,714, US 4,144,050, US 3,920,442, US 5,180,587, US 5,232,701, US 5,208,030, GB 2,095,558, US 3,299,566, Klingman, Weed Control as a Science, John

- 25 Wiley and Sons, Inc., New York, 1961, Hance et al., Weed Control Handbook, 8th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1989 und Mollet, H., Grubemann, A., Formulation technology, Wiley VCH Verlag GmbH, Weinheim (Federal Republic of Germany), 2001.

- Inerte flüssige und/oder feste Trägerstoffe geeignet für die erfindungsgemäß Formulierungen sind dem Fachman in einer Vielzahl bekannt, wie z.Bsp. flüssige Zusatzstoffe wie Mineralölfraktionen von mittlerem bis hohem Siedepunkt, wie Kerosin oder Dieselöl, ferner Kohlenteeröle sowie Öle pflanzlichen oder tierischen Ursprungs, aliphatische, cyclische und aromatische Kohlenwasserstoffe, z.B. Paraffin, Tetrahydronaphthalin, alkylierte Naphthaline oder deren Derivate, alkylierte Benzole oder deren Derivate, 35 Alkohole wie Methanol, Ethanol, Propanol, Butanol, Cyclohexanol, Ketone wie Cyclohexanon oder stark polare Lösungsmittel, z.B. Amine wie N-Methylpyrrolidon oder Wasser.

- Feste Trägerstoffe sind beispielsweise Mineralerden wie Kieselsäuren, Kieselgele, Silikate, Talkum, Kaolin, Kalkstein, Kalk, Kreide, Bolus, Löß, Ton, Dolomit, Diatomeener-

de, Calcium- und Magnesiumsulfat, Magnesiumoxid, gemahlene Kunststoffe, Düngemittel, wie Ammoniumsulfat, Ammoniumphosphat, Ammoniumnitrat, Harnstoffe und pflanzliche Produkte wie Getreidemehl, Baumrinden-, Holz- und Nußschalenmehl, Cellulosepulver oder andere feste Trägerstoffe.

5

Oberflächenaktive Stoffe (Tenside) geeignet für die erfindungsgemäßen Formulierungen sind dem Fachmann in einer Vielzahl bekannt, wie z.Bsp. Alkali-, Erdalkali-, Ammoniumsalze von aromatischen Sulfonsäuren, z.B. Lignin-, Phenol-, Naphthalin- und Di-butyl-naphthalinsulfonsäure, sowie von Fettsäuren, Alkyl- und Alkylarylsulfonaten, Alkyl-, Laurylether- und Fettalkoholsulfaten, sowie Salze sulfatiertes Hexa-, Hepta- und Octadecanolen sowie von Fettalkoholglykolether, Kondensationsprodukte von sulfoniertem Naphthalin und seiner Derivate mit Formaldehyd, Kondensationsprodukte des Naphthalins bzw. der Naphthalinsulfonsäuren mit Phenol und Formaldehyd, Polyoxyethylenoctylphenolether, ethoxyliertes Isooctyl-, Octyl- oder Nonylphenol, Alkylphenyl-, Tributylphenylpolyglykolether, Alkylaryl-polyetheralkohole, Isotridecylalkohol, Fettalkoholethylenoxid-Kondensate, ethoxyliertes Rizinusöl, Polyoxyethylenalkylether oder Polyoxypropylenealkylether, Laurylalkoholpolyglykoletheracetat, Sorbitester, Lignin-Sulfitablaugen oder Methylcellulose.

10

15

20

Die Applikation der herbiziden Zusammensetzungen bzw. der selektierten Verbindungen kann im Vorauflauf- oder im Nachauflaufverfahren erfolgen. Sind die selektierten Verbindungen für gewisse Kulturpflanzen weniger verträglich, so können Ausbringungstechniken angewandt werden, bei welchen die selektierten Verbindungen mit Hilfe der Spritzgeräte so gespritzt werden, daß die Blätter der empfindlichen Kulturpflanzen nach Möglichkeit nicht getroffen werden, während die selektierten Verbindungen auf die Blätter darunter wachsender unerwünschter Pflanzen oder die unbedeckte Bodenfläche gelangen (post-directed, lay-by).

25

30

Die Aufwandmengen an selektierten Verbindungen betragen je nach Bekämpfungsziel, Jahreszeit, Zielpflanzen und Wachstumsstadium 0.001 bis 3.0, vorzugsweise 0.01 bis 1.0 kg/ha.

35

Die Bereitstellung des herbiziden Targets ermöglicht weiterhin ein Verfahren zur Identifizierung eines Proteins mit der biologischen Aktivität einer NCR, welches nicht oder nur eingeschränkt durch ein Herbizid, welches als Wirkort die NCR hat, z.B. die herbizid wirkenden selektierten Verbindungen, gehemmt wird. Im folgenden wird ein sich derart von der NCR unterscheidendes Protein als NCR-Variante bezeichnet, welches durch eine Nukleinsäuresequenz codiert wird, welche

- i) für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase kodiert, das durch nach den oben genannten Verfahren ermittelte Substanzen mit herbizider Wirkung, welche NCR inhibieren, nicht inhibiert wird; und
- 5
- ii) welche ein funktionelles Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 52% zu der SEQ ID NO:1 umfasst; oder welche sich durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:2, das eine Identität mit der SEQ ID NO:2 von mindestens 10 39% aufweist, ableiten lässt.

In einer bevorzugten Ausführungsform besteht das oben genannte Verfahren zur Erzeugung von Nukleinsäuresequenzen codierend für NCR-Varianten von Nukleinsäuresequenzen umfassen aus folgenden Schritten:

- 15 a) Expression der von den oben genannten Nukleinsäuren kodierten Proteine in einem heterologen System oder in einem zellfreien System;
- b) Randomisierte oder gerichtete Mutagenese des Proteins durch Modifikation der Nukleinsäure;
- 20 c) Messung der Interaktion des veränderten Genprodukts mit dem Herbizid;
- d) Identifizierung von Derivaten des Proteins die eine geringere Interaktion aufweisen;
- 25 e) Testung der biologischen Aktivität des Proteins nach Applikation des Herbicides;
- f) Auswahl der Nukleinsäuresequenzen, die eine veränderte biologische Aktivität gegenüber dem Herbizid aufweisen.

30 Die erfindungsgemäßen funktionellen Äquivalente der SEQ ID NO:1 weisen eine Homologie mit der SEQ ID No:1 von mindestens 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59% vorzugsweise mindestens 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69% und 70% bevorzugt mindestens 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76% besonders bevorzugt mindestens 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90% ganz besonders bevorzugt mindestens 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% auf.

- Die erfindungsgemäßen funktionellen Äquivalente der SEQ ID NO:2 weisen eine Homologie mit der SEQ ID No:2 von mindestens 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59% vorzugsweise mindestens 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69% und
- 5 70% bevorzugt mindestens 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86% besonders bevorzugt mindestens 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93% ganz besonders bevorzugt mindestens 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% auf.
- 10 Die nach dem oben beschriebenen Verfahren nach ausgewählten Sequenzen werden vorteilhaft in einen Organismus eingebracht. Deshalb ist ein weiterer Erfindungsgegenstand ein nach diesem Verfahren hergestellter Organismus. Bevorzugt ist der Organismus eine Pflanze, besonders bevorzugt eine der oben definierten Kulturpflanzen.
- 15 Anschließend erfolgt die Regeneration ganzer Pflanzen und Überprüfung der Resistenz gegenüber der selektierten Verbindung in intakten Pflanzen.
- Veränderte Proteine und/oder Nukleinsäuren, die in Pflanzen Resistenz gegen die selektierten Verbindungen vermitteln können, können aus den oben genannten Nuklein-
- 20 säuresequenzen auch über die sogenannte "site directed mutagenesis" hergestellt werden, durch diese Mutagenese kann beispielsweise die Stabilität und/oder Aktivität des Target Proteins oder die Eigenschaften wie Bindung und Wirkung der oben genannten erfindungsgemäßen Inhibitoren sehr gezielt verbessern bzw. verändert werden.
- 25 Beispielsweise wurde von Zhu et al. (Nature Biotech., Vol. 18, May 2000: 555 - 558) eine "site directed mutagenesis"-Methode in Pflanzen beschrieben, die vorteilhaft verwendet werden kann.
- 30 Weiterhin können Veränderungen über die von Spee et al. (Nucleic Acids Research, Vol. 21, No. 3, 1993: 777- 78) beschriebenen PCR-Methode unter Verwendung von dITP zur zufälligen Mutagenese erzielt werden oder durch die von Rellos et al. (Protein Expr. Purif., 5, 1994 : 270-277) weiter verbesserte Methode.
- 35 Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung dieser veränderten Proteine und/oder von Nukleinsäuren ist eine von Stemmer et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91, 1994: 10747-10751) beschriebene "in vitro" Rekombinationstechnik für die molekulare Evolution oder die von Moore et al. (Nature Biotechnology Vol. 14, 1996: 458-467) beschriebene Kombination der PCR- und Rekombinationsmethode.

Ein weiterer Weg zur Mutagenese von Proteinen wird von Greener et al. in Methods in Molecular Biology (Vol. 57, 1996: 375-385) beschrieben. In EP-A-0 909 821 wird eine Methode zur Veränderung von Proteinen unter Verwendung des Mikroorganismus E. coli XL-1 Red beschrieben. Dieser Mikroorganismus erzeugt bei der Replikation Mutationen in den eingeführten Nukleinsäuren und führt so zu einer Veränderung der genetischen Information. Über Isolierung der veränderten Nukleinsäuren bzw. der veränderten Proteine und Testung auf Resistenz lassen sich leicht vorteilhafte Nukleinsäuren und die durch sie kodierten Proteine identifizieren. Diese können dann nach Einbringen in Pflanzen dort die Resistenz ausprägen und so zur Resistenz gegen die Herbizide führen.

Weitere Methoden der Mutagenese und Selektion sind beispielsweise Methoden wie die in vivo Mutagenese von Samen oder Pollen und Selektion resistenter Allele in Anwesenheit der erfindungsgemäßen Inhibitoren, gefolgt von genetischer und molekulärer Identifizierung des veränderten, resistenten Allels. Weiterhin die Mutagenese und Selektion von Resistzenzen in der Zellkultur durch Vermehrung der Kultur in Anwesenheit von sukzessiv steigenden Konzentrationen der erfindungsgemäßen Inhibitoren. Dabei kann die Erhöhung der spontanen Mutationsrate durch chemische/physikalische mutagene Behandlung ausgenutzt werden. Wie vorgehend beschrieben lassen sich auch mit Mikroorganismen, die eine endogene oder rekombinante Aktivität der durch die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren codierten Proteine haben, und die gegenüber den erfindungsgemäß identifizierten Inhibitoren sensitiv sind, veränderte Gene isolieren. Die Anzucht der Mikroorganismen auf Medien mit steigenden Konzentration von erfindungsgemäßen Inhibitoren erlaubt die Selektion und Evolution von resistenten Varianten der erfindungsgemäßen Targets. Die Frequenz der Mutationen kann wiederum durch mutagene Behandlungen erhöht werden.

Daneben stehen Verfahren zur gezielten Veränderungen von Nukleinsäuren zur Verfügung (Zhu et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 96, 8768 - 8773 und Beethem et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol 96, 8774 - 8778). Diese Methoden ermöglichen es, in den Proteinen solche Aminosäuren, die für die Bindung von Inhibitoren von Bedeutung sind, durch funktionell analoge Aminosäuren zu ersetzen, die jedoch die Bindung des Inhibitors verhindern.

Ein weiterer Erfindungsgegenstand ist deshalb ein Verfahren zur Erstellung von Nukleinsäuresequenzen, welche für Genprodukte kodieren, die eine veränderte biologische Aktivität aufweisen, wobei die biologische Aktivität dahingegen verändert wurde, daß eine erhöhte Aktivität vorliegt. Unter erhöhter Aktivität ist eine gegenüber dem Ausgangsorganismus bzw. gegenüber dem Ausgangsgenprodukt um mindestens 10% ,

bevorzugt um mindestens 30%, besonders bevorzugt um mindestens 50%, ganz besonders bevorzugt um mindestens 100% höhere Aktivität zu verstehen. Weiterhin kann die biologische Aktivität dahingegen verändert worden sein, daß die erfindungsgemäßen Substanzen und/oder Mittel nicht mehr oder nicht mehr richtig an die Nukleinsäuresequenzen und/oder die durch sie kodierten Genprodukte binden. Unter nicht mehr oder nicht mehr richtig ist im Sinne der Erfindung zu verstehen, daß die Substanzen um mindestens 30%, bevorzugt mindestens 50%, besonders bevorzugt um mindestens 70%, ganz besonders bevorzugt um mindestens 80% oder gar nicht mehr an die veränderten Nukleinsäuren und/oder Genprodukte im Vergleich zum Ausgangsgenprodukt oder den Ausgangsnukleinsäuren binden.

Noch ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft deshalb eine transgene Pflanze, welche mit einer Nukleinsäuresequenz, welche für ein Genprodukt kodiert, das eine veränderte biologische Aktivität aufweist, oder mit einer Nukleinsäuresequenz codierend für eine NCR-Variante transformiert wurde. Verfahren zur Transformation sind dem Fachmann bekannt und beispielhaft weiter oben ausgeführt.

Genetisch veränderten transgenen Pflanzen, die gegen die nach den erfindungsgemäßen Verfahren gefundenen Substanzen und/oder Mittel enthaltend diese Substanzen resistent sind, können auch durch Transformation gefolgt von Überexpression einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz erzeugt werden. Deshalb ist ein weiterer Erfindungsgegenstand ein Verfahren zur Erzeugung transgener Pflanzen, die gegen Substanzen, die nach einem erfindungsgemäßen Verfahren gefunden wurden, resistent sind, dadurch gekennzeichnet, daß in diesen Pflanzen Nukleinsäuren codierend für eine NCR Variante überexprimiert werden. Ein ähnliches Verfahren wird beispielhaft in Lermantova et al., Plant Physiol., 122, 2000: 75 - 83 beschrieben.

Die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren zur Erzeugung resistenter Pflanzen ermöglichen die Entwicklung neuer Herbizide, die eine möglichst umfassende Pflanzenspezies unabhängige Wirkung aufweisen (sog. Totalherbizide), in Kombination mit der Entwicklung von gegenüber dem Totalherbizid resistenten Nutzpflanzen. Gegenüber Totalherbiziden resistente Nutzpflanzen sind bereits verschiedentlich beschrieben worden. Dabei können mehrere Prinzipien zur Erzielung einer Resistenz unterschieden werden:

- a) Resistenzerzeugung in einer Pflanze über Mutationsverfahren oder gentechnische Verfahren, indem das als Zielort für das Herbizid dienende Protein deutlich überproduziert wird und indem auf Grund des großen Überschusses des als Zielort für das Herbizid dienende Protein, die von diesem Protein in der Zelle

ausgeübte Funktion auch nach Applikation des Herbizides beibehalten wird.

- b) Veränderung der Pflanze dahingehend, daß eine modifizierte Version des als Zielort des Herbizid fungierenden Proteins eingeführt wird und daß das neu eingeführte modifizierte Protein vom Herbizid nicht in seiner Funktion beeinträchtigt wird.
- c) Veränderung der Pflanze dahingehend, daß ein neues Protein/ eine neue RNA eingeführt wird welches dadurch gekennzeichnet ist, daß die für die herbizide Wirkung der niedermolekularen Substanz verantwortliche chemische Struktur des Proteins oder der Nukleinsäure wie der RNA oder der DNA so verändert wird, daß durch die veränderte Struktur keine herbizide Wirkung mehr entfaltet werden kann, daß heißt die Interaktion des Herbizids mit dem Zielort nicht mehr erfolgen kann.
- d) das die Funktion des Targets durch ein neues in die Pflanze eingebrachtes Gen ersetzt wird, und so ein sogenannter "alternativer Pathway" geschaffen wird.
- e) Das die Funktion des Targets durch ein anderes in der Pflanze vorhandenes Gen bzw. dessen Genprodukt übernommen wird.

Dem Fachmann sind alternative Verfahren zur Identifizierung von den homologen Nukleinsäuren beispielsweise in anderen Pflanzen mit ähnlichen Sequenzen wie beispielsweise unter Verwendung von Transposons, bekannt. Gegenstand dieser Erfindung ist daher auch die Verwendung von alternativen Insertionsmutageneseverfahren zur Insertion von fremder Nukleinsäuren in die Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 oder SEQ ID NO:5 in von diesen Sequenzen aufgrund des genetischen Codes abgeleitete Sequenzen und/oder deren Derivate in anderen Pflanzen.

- 30 Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt mit einer der oben beschrieben Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Expressionskassette nach ebenfalls oben beschriebenen gängigen Transformationsmethoden.

Die Wirksamkeit der Expression der transgen exprimierten NCR kann beispielsweise in vitro durch Sproßmeristemvermehrung oder durch einen Keimungstest ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des NCR Gens und deren Auswirkung auf die Resistenz gegenüber Hemmstoffen der NCR an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

Die Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele weiter veranschaulicht, die nicht als beschränkend aufgefaßt werden sollten.

#### Allgemeine DNA-Manipulations- und Klonierungsverfahren

5

Klonierungsverfahren wie z.B. RestriktionNCRaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylon Membranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von Escherichia coli Zellen, Anzucht von Bakterien und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden

10 wie bei Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) und Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1994); ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeführt.

15 Pflanzenmolekularbiologische Standardverfahren sowie Pflanzentransformationsverfahren sind beschrieben in Schultz et al., Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers (1998), Reither et al., Methods in Arabidopsis Research, World svcientific press (1992) und Arabidopsis: A Laboratory Manual (2001), ISBN 0-87969-573-0.

20

Die im folgenden verwendeten Bakterienstämme (E. coli DH5 $\alpha$ , XL-1 blue, XL10 Gold, BL21DE(3), JM 109) wurden von Stratagene, BRL Gibco oder Invitrogen, Carlsberg, CA bezogen. Zur Klonierung wurden die Vektoren pCR T7CT TOPO, pCR T7/NT TO-PO und pCR 2.1 TOPO der Firma Invitrogen und pUC 19 der Firma Amersham Pharmacia (Freiburg), pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66, 1990, 221-230) und pMALc2x (New England Biolabs) verwendet.

#### Beispiel 1: Erzeugung eines Arabidopsis-Pflanzentransformationsvektors

30 Aus einer cDNA Sequenz, kodierend für NCR aus *Arabidopsis thaliana* (Accession Nummer AB007799; Mizutani,M. and Fukuchi-Mizutani,M., 1997) wurden das Primerpaar Rei 156/Rei 157

Rei 156: 5'-TATAACCCGGGATGGATACCGAGTTCTCCGAA-3' (SEQ ID NO:5) und

35

Rei 157: 5'- TATAACCCGGGAACTGGAATTGCATCTCCGGA-3' (SEQ ID NO:6) abgeleitet. Im Anschluss wurden die Primer Rei 156/157 in einer PCR-Reaktion zur Amplification eines cDNA Fragment aus einer *Arabidopsis thaliana* cDNA-Bibliothek (Stratagene) verwendet. Die PCR wurde nach den in Tabelle 1 aufgeführten Bedin-

40 gungen durchgeführt.

Tabelle 1

Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Anzahl der Zyklen
95	300	1
95	60	
58	90	
72	300	
72	600	1

- 5 Nach Reinigung über Agarose-Gelelektrophorese wurde das erhaltene Fragment (SEQ ID NO:1) nach Herstellerangaben in den Vektor pPCRScript kloniert (pPCRScript-NCR). Durch Sequenzierung konnte die Identität des Arabidopsis NCR cDNA Klons in voller Länge bestätigt werden.
- 10 Der Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer 1990, Plant Science 66, 221-230) wurde mit SmaI gespalten und mit dem aus dem Vektor pPCRScript-NCR über SmaI isolierten NCR Fragement ligiert (pBinAR-NCR). Der Ligationsansatz wurde in XL10 Gold E. coli Zellen transformiert und pBinAR-NCR enthaltende Klone über eine Digoxigenin-markierte NCR-Sonde (Roche) mit Hilfe von Anti-Digoxigenin-Antikörpern identifiziert.
- 15 Der Nachweis der Antisense Orientierung der NCR-cDNA in pBinAR-NCR erfolgte durch Sequenzierung sowie über PCR-Reaktionen mit 2 verschiedenen Primerpaaren (Rei 143 und Rei 196, bzw. Rei 144 und Rei 195) nach den in Tabelle 2 aufgeführten Bedingungen.

## 20 Tabelle 2

Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Zyklennanzahl
95	120	1
95	60	
58	60	
72	120	
72	300	1

Die Antisense-Orientierung der NCR konnte mit den Primern

- 25 Rei 143: 5'-GCTATGACCATGATTACGCC-3' (SEQ ID NO:7) und  
 Rei 196: 5'-TGAGACATCCGTCTTGC-3' (SEQ ID NO:8)

könnte über das Entstehen eines 740bp langen DNA-Fragments und mit den Primern

Rei 144: 5'-ACGTTGTAAAACGACGGCCA-3' (SEQ ID NO:9)

und

5

Rei 195: 5'-CCGACTACGTTAGACTCTG-3' (SEQ ID NO:10)

über das Entstehen eines 885bp langen DNA-Fragments nachgewiesen werden.

10

Beispiel 2: Transformation und Analyse von Arabidopsispflanzen

Das Konstrukt pBinAR-NCR wurde in Agrobakterienstamm pGV 2260 transformiert.

Zur Transformation von Arabidopsispflanzen wurde eine positiv transformierte Agro-

15

bakterienkolonie eingesetzt. Der Nachweis der Anwesenheit des Konstrukts pBinAR-NCR in einer Agrobakterienkolonie wurde über PCR mit den Primern Rei 156 und Rei 157 über PCR nach den in Tabelle 2 aufgeführten Bedingungen. Als DNA-Template diente eine direkt von der Agarplatte entnommenen Menge einer Agrobakterienkolonie.

20

Von einer einzelnen Kolonie positiv transformierter Agrobakterien auf einer Platte wurde eine 4 ml LB-Medium Kultur (LB-Medium: 10 g/l Pepton, 5 g/l Hefe Extrakt, 10 g/l NaCl; pH 7.0; 80 mg/l Kanamycin/l und 25 mg/l Rifampicin) inkuliert, über Nacht bei 28°C inkubiert. Im Anschluß wurde mit dieser Kultur eine 400 ml LB-Medium Kultur (LB-Medium mit 80 mg Kanamycin/ml und 25 mg/ml Rifampicin) inkuliert. Nach

25

12 stündiger Inkubation bei 28°C und 220 rpm wurde die Kultur präzipitiert (8.000 rpm, 20 min.) und in Transformationsmedium resuspendiert (1/2 MS-Media nach Murashige T. und Skoog F. 1962. Physiologia Plantarum. 15: 473-497; Owen H.R. and Miller A.R. 1992. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 28: 147-150; 0,5g/l 2-(N-Morpholino)-ethanesulfonic acid), pH 5,8; 50 g/l Saccharose). In die erhaltene Suspension wurden

30

blütentragende Arabidopsispflanzen dreimal jeweils im Abstand von 2,5 Tagen ca. 5-mal hineingetaucht und anschließend in Töpfen mit feuchter Erde überführt. Nach 6 Wochen Inkubation unter Langtagbedingungen in Klimakammern (Tagsüber 22-24°C, Nachts 19°C; 65% relative Luftfeuchtigkeit) wurden die Samen der Pflanzen geerntet.

35

Beispiel 3: Analyse der transgenen Pflanzen

Zur Analyse werden Samen der transformierten Pflanzen aus Beispiel 2 auf Agar-Selektionsplatten (2,15 g/l Murashige+Skoog micro and macro elements (Fa. DUCHE-FA; nach Murashige T. und Skoog F. 1962. Physiologia Plantarum. 15: 473-497; Owen H.R.; Miller A.R. 1992. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 28: 147-150) 0,1 g/l Myo-

40

Inositol, 0,5 g/l MES, 10 g/l Saccharose, pH 5,7, 1ml Gew.-% Vitamin B5, 50 µg/l Kanamycin; 15g/l Agar Agar).

Auf den Selektionsplatten gewachsene Pflanzen wurden nach 3 - 4 Wochen auf Erde  
5 gesetzt und 4 - 8 Wochen bei Langtagbedingungen in Klimakammern inkubiert (Tagsüber 22-24°C, Nachts 19°C; 65% relative Luftfeuchtigkeit). Die Samen wurden nach 6 Wochen geerntet. Die Integration des Antisense-NCR-Gens in das Genom der transgenen Pflanzen wurde über PCR nach den in Tabelle 3 aufgeführten Bedingungen verifiziert.

10

Tabelle 3

Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Zyklenanzahl
95	120	1
95	60	34
45-50	60	
72	120	1
72	300	

Als Template diente genomische DNA (Isolation mittels des "DNeasy Plant Mini "-Kits von QIAGEN nach Herstellerangaben), die aus Blattmaterial der entsprechenden transgenen Linien präpariert wurde. Als Positivkontrolle diente das zur Transformation verwendete NCR-Antisense-pBinAR-Konstrukt. Durch gezielte Wahl der Primer konnten sowohl das intrinsische genomische Gen, welches ein Intron enthält und somit länger ist als die Antisense-NCR-cDNA, als auch die Antisense-NCR-cDNA selbst nachgewiesen werden. Bei Anwesenheit der Antisense-NCR-cDNA im Genom der transgenen Pflanzen betragen die erwarteten Fragmentlänge für die genomische NCR (mit einem Intron) ca. 1800bp bei Verwendung der Primer

25

Rei 524: 5'-TTCGTTGCTTCGTCGCCGTT-3' (SEQ ID NO:11) und

Rei 525: 5'-GTTTGCAGCCATGGCCTTGTT-3' (SEQ ID NO:12)

sowie 750bp für die Antisense-NCR-cDNA bei Verwendung der Primer

30

Rei 524: 5'-TTCGTTGCTTCGTCGCCGTT-3' (SEQ ID NO:11) und

Rei 527: 5'- GGCGGGAAACGACAATCTGATC-3' (SEQ ID NO:13).

- Transgene Pflanzen, die das Konstrukt pBinAR-NCR Antisense enthielten, wiesen hohe Anthocyaninanhäufungen, also stark gestresste Blätter und Adern, chlorotische Blätter sowie eine drastische Wachstumsverzögerung auf: So hatten Transgene Pflanzen (TO-Generation) nur 1-10% der Frischmasse von Wildtyppflanzen nach 6 Wochen
- 5 Kultivierung auf Erde bei Langtagbedingungen in Klimakammern (Tagsüber 22-24°C, Nachts 19°C; 65% relative Luftfeuchtigkeit. Die Samen, die sich in den Schoten der Pflanzen der transformierten TO-Generation entwickelten, waren verkümmert und keimten in 100% aller Fälle nicht.
- 10 Hiermit wurde erstmalig und überraschend gezeigt, dass die natürliche Expression von für NCR codierenden Sequenzen essenziell für Pflanzen ist und eine verringerte Expression zu Schädigungen entsprechend den vorstehend genannten Phänotypen führt. Somit konnte gezeigt werden, dass sich NCR als Herbizidtarget eignet.
- 15 Beispiel 4: Expression in E.coli
- Zur Erzeugung aktiven Proteins mit pflanzlicher NCR-Aktivität wurde eine cDNA aus Arabidopsis codierend für eine NCR (Genbank Accession Nummer: AB007799) in E. coli Bakterien überexprimiert. Hierfür wurde die für NCR kodierende Nukleinsäuresequenz nach Standardbedingungen via PCR (z.B. nach Sambrook, J. et al. (1989) "Molecular cloning: A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press; 34 Zyklen; Annealingtemperatur 60°C; Polymerisationszeit 2 min) mit pBinAR-NCR als Template und den Primern
- 20 Rei 153: 5'- TATAGAATTGATGGATACCGAGTTCTCCGAA-3' (EcoRI) (SEQ ID NO:14)
- Rei 483: 5'- TATACTGCAGTCAGAACTGGAATTGCATCTCCGG-3' (PstI) (SEQ ID NO:15)
- 25 enthaltend die Restriktionsenzymschnittstellen EcoRI und PstI amplifiziert und in den Vektor pMAL-c2x (New England Biolabs) über die Restriktionsenzymschnittstellen EcoRI und PstI kloniert (pMAL-c2x-NCR).
- 30
- 35 Die pMAL-c2x-NCR Konstrukte wurden in E.coli-Stamm JM109 (Stratagene) transformiert und NCR nach Herstellerangaben über IPTG als Fusionsprotein mit Maltose-Binding-Protein (NCR-MBP) exprimiert. Die Proteinaufreinigung via Affinitätschromatographie mit einer Maltose säule wurde wie vom Hersteller New England Biolabs beschrieben durchgeführt.

**Beispiel 5: in vitro Testsysteme**

Die Aktivität der NCR wurde mit NCR, die gemäß Beispiel 4 rekombinant exprimiert wurde (Fukuchi-Mizutani et al., Plant Physiol. 119, pp. 353-361, 1999) oder nach dem 5 von Jollie et al. (Plant Physiol. 85, pp. 457-462, 1987) beschriebenen Verfahren isoliert wurde, bestimmt nach der Methode von Mihara und Sato (Methods Enzymol., 52, 1978, pp. 102-108).

Nach Mihara und Sato (Methods Enzymol., 52, 1978, pp. 102-108) werden 1-10 $\mu$ g ge-10 reinigtes NCR-MBP Protein in 100 $\mu$ l Puffer (100 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer (zu gleichen Teilen gemischt) mit 1 mM Kalium-Ferricyanid versetzt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0,3 mM  $\beta$ -NADH gestartet.

Photometrisch gemessen wird die Reduktion von Kalium-Ferricyanid bei 420 nm und 15 25°C in einem Zeitraum von 5 bis 15 min gemessen.

**Beispiel 6: Identifizierung eines funktionellen Analogon aus Tabak**

Zur Erzeugung einer cDNA-Bibliothek (im folgenden "binäre cDNA-Bank" genannt) in 20 einem Vektor, der direkt für die Transformation von Pflanzen verwendet werden kann, wurde mRNA aus verschiedenen Pflanzengeweben isoliert und mit dem TimeSaver cDNA Synthese Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Erststrangsynthese wurde mit T<sub>12-18</sub> Oligonukleotiden nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach Größenfraktionierung und Ligation von EcoRI-25 NotI-Adaptoren nach Herstellerangaben und Auffüllen der Überhänge mit Pfu DNA Polymerase (Stratagene) wurde die cDNA-Population normalisiert. Hierzu wurde die Methode nach Kohci et al, 1995, Plant Journal 8, 771-776 vorgegangen, wobei die cDNA durch PCR mit dem Oligonukleotid N1 unter den in Tabelle 4 aufgeführten Bedingungen amplifiziert wurde.

30

**Tabelle 4**

Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Zyklenummer
94	300	1
94	8	10
52	60	
72	180	
94	8	10
50	60	
72	180	

94	8	
48	60	10
72	180	
72	420	1

Das erhaltene PCR-Produkt wurde an die Säulenmatrix des PCR-Purification Kits (Qiagen, Hilden) gebunden und mit 300 mM NaP-Puffer, pH 7.0, 0.5 mM EDTA, 0.04% SDS eluiert. Die DNA wurde 5 Minuten im kochenden Wasserbad denaturiert und anschließend 24 Stunden bei 60°C renaturiert. 50µl der DNA wurden auf eine Hydroxylapatitsäule aufgetragen und diese 3 Mal mit 1 ml 10 mM NaP-Puffer, pH 6.8 gewaschen. Die gebundene Einzelstrang-DNA wurde mit 130 mM NaP-Puffer, pH 6.8 eluiert, mit Ethanol gefällt und in 40µl Wasser gelöst. Hiervon wurden 20µl für eine weitere PCR-Amplifikation wie oben beschrieben verwendet. Nach einer weiteren Anreicherung von ssDNA wurde eine dritte PCR-Amplifikation wie oben beschrieben durchgeführt.

Die Herstellung des Pflanzentransformationsvektors zur Aufnahme der wie oben beschrieben hergestellten cDNA-Population erfolgte über Restriktionsenzym-Verdau des Vektor pUC18 mit SbfI und BamHI, Reinigung des Vektorfragment gefolgt von Auffüllen der Überhänge mit Pfu DNA Polymerase und Religation mit T4 DNA Ligase (Stratagene). Das so hergestellte Konstrukt wird im folgenden als pUC18SbfI- bezeichnet.

Der Vektor pBinAR wurde zunächst mit NotI gespalten, nach Auffüllen der Enden religiert, mit SbfI gespalten, nach Auffüllen der Enden religiert und im Anschluß mit EcoRI und HindIII gespalten. Das resultierende Fragment wurde in ein Derivat des binären Pflanzentransformationsvektors pPZP (Hajdukiewicz,P, Svab, Z, Maliga, P., (1994) Plant Mol Biol 25:989-994) ligiert, der eine Transformation von Pflanzen mittels Agrobakterium ermöglicht und eine Kanamycinresistenz in transgenen Pflanzen vermittelt, ligiert. Das hierbei erzeugte Konstrukt wird im folgenden als pSun12/35S bezeichnet.

pUC18SbfI- wurde als Template für eine Polymerase Kettenreaktion (PCR) mit den Oligonucleotiden V1 und V2 (siehe Tabelle 3) und Pfu DNA Polymerase eingesetzt. Das resultierende Fragment wurde in den mit SmaI gespaltenen pSun12/35S ligiert, wodurch pSunblues2 erzeugt wurde. Nach Spaltung mit NotI, Dephosphorylierung mit Shrimp Alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics, Mannheim) und Aufreinigung des Vektorfragmentes wurde pSunblues2 mit der normalisierten und ebenfalls mit NotI gespaltenen cDNA Population ligiert. Nach Transformation in E.coli XL-1blue (Stratagene) wurden die so erzeugte Klone in Mikrotiterplatten abgelegt. Die binäre cDNA-Bank enthält cDNAs in "Sense"- und in "Antisense"-Orientierung unter Kontrolle des Blumen-

kohlmosaikvirus 35s Promotors, die dementsprechend nach der Transformation in Tabakpflanzen zu "Cosuppressions"- und "Antisene"-Effekten führen können.

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide

5

Oligonukleotid	Nukleinsäuresequenz
N1 (SEQ ID NO:16)	5'-AGAATTGCGGGCCGCT-3'
V1 (PWL93not) (SEQ ID NO:17)	5'-CTCATGCGGCCGCGCAACGCAATTAATGTG-3'
V2 (pWL92) (SEQ ID NO:18)	5'-TCATGCGGCCGCGAGATCCAGTTGATGTAAC-3'
G1 (35S) (SEQ ID NO:19)	5'-GTGGATTGATGTGATATCTCC-3'
G2 (OCS) (SEQ ID NO:20)	5'-GTAAGGATCTGAGCTACACAT-3'

Die Identifizierung einer für NCR kodierenden Sequenz erfolgte über eine Digoxigenin markierte Sonde hergestellt über den DIG DNA Labeling Mix (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben, wobei das Plasmid pMAL-c2x-NCR unter Standardbedingungen

10 über PCR mit den Primern

Rei 111: 5'-ATGGATAACCGAGTTCTCCGAA-3' (SEQ ID NO:21) und

Rei 222: 5'-AACTGGAATTGCATCTCCGGA-3' (SEQ ID NO:22)

15

amplifiziert wurde. Die so hergestellte Sonde wurde zur Durchmusterung der cDNA Bank aus Nicotiana tabacum eingesetzt. Die cDNA Bank wurde mit einem Titer von  $2,5 \times 10^5$  Plaque bildenden Einheiten ausplattiert und mit Hilfe der Plaque-Durchmusterungsmethode analysiert (T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 1989). Es wurden 12 Phagenpopulationen isoliert, mit denen eine zweite Durchmusterung durchgeführt wurde, wodurch genetisch einheitlich Phagen-Populationen isoliert werden konnten, die zur in vivo Excision verwendet wurden. Durch Restriktionsanalyse konnten keine Unterschiede zwischen den cDNA Klonen festgestellt werden und es wurden vier Klone mit den größten Insertionen zur Sequenzierung ausgewählt. Die Sequenzdaten dieser Klone ergaben die SEQ ID NO:3, die mit der SEQ ID NO:1 zu 77% identisch ist.

20

25

## Patentansprüche

1. Verwendung von einem Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase kodiert durch eine Nukleinsäuresequenz bestehend aus  
5
  - a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
  - b) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lässt; oder
  - c) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:2, das eine Identität mit der SEQ ID NO:2 von mindestens 39% aufweist, ableiten lässt; oder
  - d) einem funktionellen Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 52% zu der SEQ ID NO:1
2. Pflanzliche Nukleinsäuresequenzen kodierend für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase enthaltend einen Teilbereich umfassend:  
25
  - a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:3 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
  - b) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:4 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lässt; oder
  - c) funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3 mit einer Identität von mindestens 77% zu der SEQ ID NO:3;
  - d) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funk-

tionellen Äquivalents der SEQ ID NO:4, das eine Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 87% aufweist, ableiten läßt.

3. Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase als Target für Herbizide kodiert von einem Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 2.
4. Verfahren zur Detektion funktioneller Analoga der SEQ ID NO:1
  - 10 a) durch Herstellung einer Sonde gefolgt von anschließenden Durchsuchen einer genomischen oder cDNA Bank der entsprechenden Spezies; oder
  - b) einer Computer-Recherche nach analogen Sequenzen in elektronischen Datenbanken.
- 15 5. Expressionskassette umfassend
  - a) genetische Kontrollsequenzen in funktioneller Verknüpfung mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 2; oder
  - 20 b) zusätzliche Funktionselemente; oder
  - c) eine Kombination aus a) und b).
- 25 6. Vektor umfassend eine Expressionskassette nach Anspruch 5.
7. Nicht humaner transgener Organismus umfassend mindestens eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase gemäß Anspruch 2, eine Expressionskassette gemäß Anspruch 5 oder einen Vektor gemäß Anspruch 6 ausgewählt aus Bakterien, Hefen, Pilzen, tierischen oder pflanzlichen Zellen.
- 30 8. Verwendung eines Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase kodiert durch eine Nukleinsäuresequenz enthaltend
  - 35 a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

## 52

- b) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lässt; oder
- 5 c) funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 52% zu der SEQ ID NO:1;
- d) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:2, das eine Identität mit der SEQ ID NO:2 von mindestens 39% aufweist, ableiten lässt.

in einem Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider Wirkung.

15 9. Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider Wirkung umfassend die folgenden Schritte:

i. Inkontaktbringen eines Polypeptides mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase kodiert durch eine Nukleinsäuresequenz bestehend aus

20 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz;

b) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lässt;

25 c) einem funktionellen Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 52% zu der SEQ ID NO:1; oder

d) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:2, das eine Identität mit der SEQ ID NO:2 von mindestens 39% aufweist, ableiten lässt

30 mit einer oder mehreren Testverbindungen unter Bedingungen, die die Bindung der Testverbindung(en) an die NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase erlauben; und

35

40

- ii. Nachweis, ob die Testverbindung an die NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase aus i) bindet; oder
- 5           iii. Nachweis, ob die Testverbindung die Aktivität der NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase aus i) reduziert oder blockiert; oder
- iv. Nachweis, ob die Testverbindung die Transkription, Translation oder Expression der der NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase aus i) reduziert oder blockiert.
- 10           10. Verfahren nach den Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass
- i. NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase, die durch eine Nukleinsäuresequenz bestehend aus
    - a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
    - b) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lässt; oder
    - c) einem funktionellen Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 52% zu der SEQ ID NO:1; oder
    - d) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:2, das eine Identität mit der SEQ ID NO:2 von mindestens 39% aufweist, ableiten lässt
- 20           kodiert wird, entweder in einem transgenen Organismus exprimiert wird oder ein Organismus, der naturgemäß NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase enthält, kultiviert wird;
- 25           35           ii. die NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase aus Schritt i) im Zellaufschluss des transgenen bzw. nicht transgenen Organismus, in partiell gereinigter Form oder in zur Homogenität gereinigten Form mit einer Testverbindung in Kontakt gebracht wird; und
- 30           40

- iii. eine Testverbindung selektiert wird, welche die Aktivität der NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase aus Schritt i) reduziert oder blockiert, wobei die Aktivität der mit der Testverbindung inkubierten NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase mit der Aktivität einer nicht mit einer Testverbindung inkubierten NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase verglichen wird.
- 5 11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt iii) die Aktivität der NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase photometrisch über den Einsatz von Ferricytochrom b5, Kalium-Ferricyanid, 2,6-Dichlorphenolindophenol, Methemerythrin, p-Benzoquinon oder 5-Hydroxy-1,4-Naphtoquinon als Substrat bestimmt wird.
- 10 12. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgende Schritte umfasst:
- i. Herstellung eines transgenen Organismus nach Anspruch 7 oder eines transgenen Organismus enthaltend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase bestehend aus
- 20 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
- 25 b) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lässt;
- 30 c) einem funktionellen Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 52% zu der SEQ ID NO:1; oder
- 35 d) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:2, das eine Identität mit der SEQ ID NO:2 von mindestens 39% aufweist, ableiten lässt,

wobei in dem transgenen Organismus das Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase überexprimiert wird; und

- 5        ii. Aufbringen einer Testsubstanz auf den transgenen Organismus nach Anspruch i) und auf einen nicht-transgenen Organismus des gleichen Genotyps;
  - 10      iii. Bestimmen des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit des transgenen und des nicht transgenen Organismus nach der Aufbringung der Testsubstanz; und
  - 15      iv. Selektion von Testsubstanzen, die ein vermindertes Wachstum oder eine eingeschränkte Überlebensfähigkeit des nicht-transgenen Organismus bewirken verglichen mit dem Wachstum des transgenen Organismus.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass es in einem pflanzlichen Organismus oder einer Hefe durchgeführt wird.
- 20     14. Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit wachstumsregulatorischer Wirkung, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgende Schritte umfasst:
- 25      i. Herstellung einer transgenen Pflanze enthaltend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase bestehend aus
    - 30      a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
    - b) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lässt;
    - 35      c) einem funktionellen Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 52% zu der SEQ ID NO:1; oder
    - d) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz

eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:2, das eine Identität mit der SEQ ID NO:2 von mindestens 39% aufweist, ableiten lässt;

5 wobei in der transgenen Pflanze das Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase überexprimiert wird;

- ii. Aufbringen einer Testsubstanz auf die transgene Pflanze nach i) und auf eine nicht-transgene Pflanze der gleichen Sorte;
- 10 iii. Bestimmen des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der transgenen und der nicht transgenen Pflanze nach dem Aufbringen der Testsubstanz; und Selektion von Testsubstanzen, die ein verändertes Wachstum der nicht-transgenen Pflanze bewirken verglichen mit dem Wachstum der transgenen Pflanze.
- 15
- 15. Träger, der eines oder mehrere der Nukleinsäuremoleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 2, oder eine oder mehrere Expressionskassetten nach Anspruch 5, einen oder mehrere Vektoren nach Anspruch 6, einen oder mehrere Organismen nach Anspruch 7 oder eines oder mehrere (Poly)peptide nach Anspruch 3 aufweist.
- 20
- 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Identifizierung der Substanzen in einem High-Throughput-Screening durchgeführt wird.
- 25
- 17. Verbindungen mit herbizider Wirkung identifiziert über eines der Verfahren nach den Ansprüchen 9 bis 13 und 16.
- 30 18. Verbindungen mit wachstumsregulatorischer Wirkung identifiziert über das Verfahren nach den Ansprüchen 14 und 16.
- 19. Verfahren zur Herstellung einer agrochemischen Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet dass man
- 35 a) eine Verbindung mit herbizider Wirkung über eines der Verfahren nach den Ansprüchen 9 bis 13 und 16 oder eine Verbindung mit wachstumsregulatorischer Wirkung nach den Ansprüchen 14 und 16 identifiziert; und

- b) diese Verbindung zusammen mit geeigneten Hilfsmitteln zu Pflanzenschutzmitteln mit herbizider oder wachstumsregulatorischer Wirkung formuliert.
- 5 20. Verfahren zur Bekämpfung von unerwünschtem Pflanzenwuchs und/oder zur Regulation des Wachstums von Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine Verbindung nach Anspruch 17 oder 18 oder eine Zusammensetzung erhältlich über das in Anspruch 19 genannte Verfahren auf Pflanzen, deren Lebensraum und/oder auf Samen einwirken läßt.
- 10 21. Verwendung einer Verbindung nach Anspruch 17 oder 18 oder einer agrochemischen Formulierung erhältlich über das in Anspruch 19 genannte Verfahren in einem Verfahren nach Anspruch 20 zur Bekämpfung von unerwünschtem Pflanzenwuchs und/oder zur Regulation des Wachstums von Pflanzen.
- 15 22. Verfahren zur Erzeugung von Nukleinsäuresequenzen, welche für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase kodieren, welches durch Substanzen nach Anspruch 17 nicht inhibiert wird; und durch ein funktionelles Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 52% zu der SEQ ID NO:1 umfasst werden, dadurch gekennzeichnet, daß es folgende Prozessschritte umfaßt:
- 20 a) Expression des von der Nukleinsäuresequenz gemäß i) kodierten Proteins in einem heterologen System oder in einem zellfreien System;
- 25 b) Randomisierte oder gerichtete Mutagenese des Proteins durch Modifikation der Nukleinsäure;
- 30 c) Messung der Interaktion des veränderten Genprodukts mit dem Herbizid;
- d) Identifizierung von Derivaten des Proteins die eine geringere Interaktion aufweisen;
- 35 e) Testung der biologischen Aktivität des Proteins nach Applikation des Herbizides; und
- f) Auswahl der Nukleinsäuresequenzen, die eine veränderte biologische Aktivität gegenüber dem Herbizid aufweisen.

23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die gemäß Anspruch 22 f) ausgewählten Sequenzen in einen Organismus eingebracht werden.
24. Verfahren zur Erzeugung transgener Pflanzen, die gegen Substanzen nach Anspruch 17 resistent sind, dadurch gekennzeichnet, daß in diesen Pflanzen eine Nukleinsäuresequenz codierend für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase, welche
- a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
- b) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder
- c) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:2, das eine Identität mit der SEQ ID NO:2 von mindestens 39% aufweist, ableiten läßt; oder
- d) ein funktionelles Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 52% zu der SEQ ID NO:1 umfasst, überexprimiert wird.
25. Transgene Pflanze hergestellt nach einem Verfahren gemäß Anspruch 24.

1/10

**A** **SEQUENCE LISTING**

## 5 <110> BASF Aktiengesellschaft

10 <120> NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase als Target für Herbizide

<130> PF 53755

15

<150> DE 102 32 778

<151> 2002-07-18

20

<160> 22

25

<170> PatentIn version 3.1

30

40

18 [ANSWER](#) [\(2\)](#) [\(3\)](#)

- 10 -

30

atg gat

```

atg gat acc gag ttt ccc cga acc cca gag cgg cag tcc ttt tgg
Met Asp Thr Glu Phe Leu Arg Thr Leu Asp Arg Gln Ile Leu Leu Gly
1           5           10          15

```

48

55

gtc ttc gtt gct ttc gtc gcc gtt ggt gct ggt gct gct tat ttt ttt  
 Val Phe Val Ala Phe Val Ala Val Gly Ala Gly Ala Ala Tyr Phe Leu  
 20 25 30

96

60

aca tcc tcc aag aaa cgc aga gtg tgt ttg gat cca gag aat ttc aag  
 Thr Ser Ser Lys Lys Arg Arg Val Cys Leu Asp Pro Glu Asn Phe Lys  
                  35                 40                 45

144

	gag ttc aag ctt gtt aag aga cat cag ctt agt cac aat gtg gcc aag Glu Phe Lys Leu Val Lys Arg His Gln Leu Ser His Asn Val Ala Lys 50 55 60	192
5	ttc gtt ttt gaa ctc cca act tct act tct gtg ttg ggt ctt ccc att Phe Val Phe Glu Leu Pro Thr Ser Thr Ser Val Leu Gly Leu Pro Ile 65 70 75 80	240
10	gga caa cac atc agt tgc agg gga aag gat ggt caa gga gag gat gtt Gly Gln His Ile Ser Cys Arg Gly Lys Asp Gly Gln Gly Glu Asp Val 85 90 95	288
15	att aag cca tac acc ccg act acg tta gac tct gac gtt gga cgt ttc Ile Lys Pro Tyr Thr Pro Thr Leu Asp Ser Asp Val Gly Arg Phe 100 105 110	336
20	gaa ctt gtc att aag atg tat ccg caa gga cgg atg tct cat cat ttc Glu Leu Val Ile Lys Met Tyr Pro Gln Gly Arg Met Ser His His Phe 115 120 125	384
	agg gag atg cgt gtt gga gac cat ctt gcc gta aag gga cca aag ggt Arg Glu Met Arg Val Gly Asp His Leu Ala Val Lys Gly Pro Lys Gly 130 135 140	432
25	agg ttc aag tat caa cca ggt cag ttt agg gca ttt gga atg ctt gct Arg Phe Lys Tyr Gln Pro Gly Gln Phe Arg Ala Phe Gly Met Leu Ala 145 150 155 160	480
30	gga ggt tca ggc atc act ccc atg ttc caa gtg gcc aga gca att cta Gly Gly Ser Gly Ile Thr Pro Met Phe Gln Val Ala Arg Ala Ile Leu 165 170 175	528
35	gaa aac cca aca gac aag aca aag gtg cat ctc att tac gcc aac gtc Glu Asn Pro Thr Asp Lys Thr Lys Val His Leu Ile Tyr Ala Asn Val 180 185 190	576
40	aca tac gac gac att ctc ttg aag gaa gaa ttg gag ggt ctt act acc Thr Tyr Asp Asp Ile Leu Leu Lys Glu Leu Glu Gly Leu Thr Thr 195 200 205	624
	aat tac cct gaa caa ttt aaa atc ttc tat gtt ttg aac cag cct ccg Asn Tyr Pro Glu Gln Phe Lys Ile Phe Tyr Val Leu Asn Gln Pro Pro 210 215 220	672
45	gaa gta tgg gat ggt ggt gtt gga ttt gta tca aag gaa atg att cag Glu Val Trp Asp Gly Gly Val Gly Phe Val Ser Lys Glu Met Ile Gln 225 230 235 240	720
50	act cat tgc cct gca cct gca tct gat att cag atc cta aga tgc gga Thr His Cys Pro Ala Pro Ala Ser Asp Ile Gln Ile Leu Arg Cys Gly 245 250 255	768
55	cca ccg cca atg aac aag gcc atg gct gca aac ctt gaa gct ctg gga Pro Pro Pro Met Asn Lys Ala Met Ala Ala Asn Leu Glu Ala Leu Gly 260 265 270	816
	tac tct ccg gag atg caa ttc cag ttc tga Tyr Ser Pro Glu Met Gln Phe Gln Phe	846
60	275 280	

<210> 2

<211> 281

5 <212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

10

<400> 2

Met Asp Thr Glu Phe Leu Arg Thr Leu Asp Arg Gln Ile Leu Leu Gly  
1 5 10 15

15

Val Phe Val Ala Phe Val Ala Val Gly Ala Gly Ala Ala Tyr Phe Leu  
20 25 30

20

Thr Ser Ser Lys Lys Arg Arg Val Cys Leu Asp Pro Glu Asn Phe Lys  
35 40 45

25

Glu Phe Lys Leu Val Lys Arg His Gln Leu Ser His Asn Val Ala Lys  
50 55 60

30

Phe Val Phe Glu Leu Pro Thr Ser Thr Ser Val Leu Gly Leu Pro Ile  
65 70 75 80

35

Gly Gln His Ile Ser Cys Arg Gly Lys Asp Gly Gln Gly Glu Asp Val  
85 90 95

40

Ile Lys Pro Tyr Thr Pro Thr Thr Leu Asp Ser Asp Val Gly Arg Phe  
100 105 110

45

Glu Leu Val Ile Lys Met Tyr Pro Gln Gly Arg Met Ser His His Phe  
115 120 125

50

Arg Glu Met Arg Val Gly Asp His Leu Ala Val Lys Gly Pro Lys Gly

130

135

140

55

Arg Phe Lys Tyr Gln Pro Gly Gln Phe Arg Ala Phe Gly Met Leu Ala  
145 150 155 160

55

Gly Gly Ser Gly Ile Thr Pro Met Phe Gln Val Ala Arg Ala Ile Leu  
165 170 175

60

Glu Asn Pro Thr Asp Lys Thr Lys Val His Leu Ile Tyr Ala Asn Val  
180 185 190

Thr Tyr Asp Asp Ile Leu Leu Lys Glu Glu Leu Glu Gly Leu Thr Thr  
195 200 205

Asn Tyr Pro Glu Gln Phe Lys Ile Phe Tyr Val Leu Asn Gln Pro Pro  
210 215 220

5

Glu Val Trp Asp Gly Gly Val Gly Phe Val Ser Lys Glu Met Ile Gln  
225 230 235 240

10

Thr His Cys Pro Ala Pro Ala Ser Asp Ile Gln Ile Leu Arg Cys Gly  
245 250 255

15

Pro Pro Pro Met Asn Lys Ala Met Ala Ala Asn Leu Glu Ala Leu Gly  
260 265 270

20

Tyr Ser Pro Glu Met Gln Phe Gln Phe  
275 280

<210> 3

25 <211> 729

<212> DNA

30 <213> Nicotiana tabacum

<220>

35 <221> CDS

<222> (1)..(726)

40 <223>

<400> 3

45 gta tgc ttg gat cct gag agg ttc aag gaa ttt aag ctt gtg aag cgt 48  
Val Cys Leu Asp Pro Glu Arg Phe Lys Glu Phe Lys Leu Val Lys Arg  
1 5 10 15

50 aca caa ata agc cac aat gtt gca aag ttc aga ttt gaa ctc ccc aca 96  
Thr Gln Ile Ser His Asn Val Ala Lys Phe Arg Phe Glu Leu Pro Thr  
20 25 30

cct act tct gta ttg ggc cta ccc att gga caa cat att agt tgc agg 144  
Pro Thr Ser Val Leu Gly Leu Pro Ile Gly Gln His Ile Ser Cys Arg  
35 40 45

55 ggc aag gat agt caa ggt gaa gag gtt aaa ccg tac aca cca act 192  
Gly Lys Asp Ser Gln Gly Glu Glu Val Val Lys Pro Tyr Thr Pro Thr  
50 55 60

60 act ttg gat tca gat gtt gga tat ttt gaa cta gtt att aag atg tat 240  
Thr Leu Asp Ser Asp Val Gly Tyr Phe Glu Leu Val Ile Lys Met Tyr  
65 70 75 80

	cct caa gga agg atg tct cat cat ttc cga gaa atg cgt gag ggt gat Pro Gln Gly Arg Met Ser His His Phe Arg Glu Met Arg Glu Gly Asp	288
	85 90 95	
5	tat ttg gct gtg aag gga cct aag ggc cgc ttt aag tac cag cct ggc Tyr Leu Ala Val Lys Gly Pro Lys Gly Arg Phe Lys Tyr Gln Pro Gly	336
	100 105 110	
10	caa gtg aga gca ttt gga atg ctt gct gga ggc tct ggc att acc cca Gln Val Arg Ala Phe Gly Met Leu Ala Gly Ser Gly Ile Thr Pro	384
	115 120 125	
15	atg ttt cag gtt gct aga gct att ctc gaa aat cca aat gac aag aca Met Phe Gln Val Ala Arg Ala Ile Leu Glu Asn Pro Asn Asp Lys Thr	432
	130 135 140	
20	aag gtg cac ttg ata tat gct aat gtt acc tat gaa gac ata ctt tta Lys Val His Leu Ile Tyr Ala Asn Val Thr Tyr Glu Asp Ile Leu Leu	480
	145 150 155 160	
	aag gaa cag ttg gat ggc ctt gct gct aac tat cct gac cgt ttc aaa Lys Glu Gln Leu Asp Gly Leu Ala Ala Asn Tyr Pro Asp Arg Phe Lys	528
	165 170 175	
25	att tat tac gta ctg aat cag cct cct gaa gta tgg agc ggt ggt gtt Ile Tyr Tyr Val Leu Asn Gln Pro Pro Glu Val Trp Ser Gly Gly Val	576
	180 185 190	
30	gga ttt gtg tcc aag gaa atg att cag act cat tgt cct gcc ccg gca Gly Phe Val Ser Lys Glu Met Ile Gln Thr His Cys Pro Ala Pro Ala	624
	195 200 205	
35	tct gac att cag ata ctg agg tgt ggt cca cct cca atg aac aag gct Ser Asp Ile Gln Ile Leu Arg Cys Gly Pro Pro Pro Met Asn Lys Ala	672
	210 215 220	
40	atg gct gct cat ctt gaa gcc ctt gga tac acc cca gag atg caa ttc Met Ala Ala His Leu Glu Ala Leu Gly Tyr Thr Pro Glu Met Gln Phe	720
	225 230 235 240	
	cag ttt taa Gln Phe	729
45	<210> 4	
50	<211> 242	
	<212> PRT	
	<213> Nicotiana tabacum	
55	<400> 4	
60	Val Cys Leu Asp Pro Glu Arg Phe Lys Glu Phe Lys Leu Val Lys Arg 1 5 10 15	

Thr Gln Ile Ser His Asn Val Ala Lys Phe Arg Phe Glu Leu Pro Thr  
20 25 30

5 Pro Thr Ser Val Leu Gly Leu Pro Ile Gly Gln His Ile Ser Cys Arg  
35 40 45

10 Gly Lys Asp Ser Gln Gly Glu Glu Val Val Lys Pro Tyr Thr Pro Thr  
50 55 60

15 Thr Leu Asp Ser Asp Val Gly Tyr Phe Glu Leu Val Ile Lys Met Tyr  
65 70 75 80

Pro Gln Gly Arg Met Ser His His Phe Arg Glu Met Arg Glu Gly Asp  
85 90 95

20 Tyr Leu Ala Val Lys Gly Pro Lys Gly Arg Phe Lys Tyr Gln Pro Gly  
100 105 110

25 Gln Val Arg Ala Phe Gly Met Leu Ala Gly Gly Ser Gly Ile Thr Pro  
115 120 125

30 Met Phe Gln Val Ala Arg Ala Ile Leu Glu Asn Pro Asn Asp Lys Thr  
130 135 140

35 Lys Val His Leu Ile Tyr Ala Asn Val Thr Tyr Glu Asp Ile Leu Leu  
145 150 155 160

Lys Glu Gln Leu Asp Gly Leu Ala Ala Asn Tyr Pro Asp Arg Phe Lys  
165 170 175

40 Ile Tyr Tyr Val Leu Asn Gln Pro Pro Glu Val Trp Ser Gly Gly Val  
180 185 190

45 Gly Phe Val Ser Lys Glu Met Ile Gln Thr His Cys Pro Ala Pro Ala  
195 200 205

50 Ser Asp Ile Gln Ile Leu Arg Cys Gly Pro Pro Pro Met Asn Lys Ala  
210 215 220

55 Met Ala Ala His Leu Glu Ala Leu Gly Tyr Thr Pro Glu Met Gln Phe  
225 230 235 240

Gln Phe

60 <210> 5

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

5 &lt;213&gt; Primer

&lt;400&gt; 5

10 tatacccgaa atggataaccg agtttctccg aa

32

&lt;210&gt; 6

15 &lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

20 &lt;213&gt; Primer

&lt;400&gt; 6

25 tatacccgaa gaactggaat tgcatctccg ga

32

&lt;210&gt; 7

30 &lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Primer

35

&lt;400&gt; 7

gctatgacca tgattacgcc

20

40

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 18

45 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Primer

50

&lt;400&gt; 8

tgagacatcc gtccttgc

18

55 &lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 20

60 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Primer

5 <400> 9  
acgttgtaaa acgacggcca 20

10 <210> 10  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Primer

15  
<400> 10.  
ccgactacgt tagactctg 19

20 <210> 11  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Primer

25  
<400> 11  
ttcgttgctt tcgtcgccgt t 21

30  
<210> 12  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Primer

35  
<400> 12  
gtttgcagcc atggccttgt t 21

40  
<210> 13  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Primer

45  
<400> 13  
ggcgggaaac gacaatctga tc 22

50  
<210> 13  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Primer

55  
<400> 13  
ggcgggaaac gacaatctga tc 22

60  
<210> 13  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Primer

<210> 14  
<211> 32  
5 <212> DNA  
<213> Primer

10 <400> 14 tatagaattc atggataccg agtttctccg aa 32  
15 <210> 15  
<211> 34  
<212> DNA  
20 <213> Primer

25 <400> 15 tataactgcag tcagaactgg aattgcacatct ccgg 34  
30 <210> 16  
<211> 16  
<212> DNA  
35 <213> Primer

40 <400> 16 agaattcgcg gccgct 16  
45 <210> 17  
<211> 32  
<212> DNA  
50 <213> Primer

55 <400> 17 ctcatgcggc cgcgcgcaac gcaattaatg tg 32  
60 <210> 18  
<211> 32  
<212> DNA

<213> Primer

5 <400> 18  
tcatgcggcc gcgagatcca gttcgatgtac 32  
  
10 <210> 19  
<211> 21  
<212> DNA  
  
15 <213> Primer  
  
  
20 <400> 19  
gtggattgtat gtgatatctc c 21  
  
<210> 20  
<211> 21  
<212> DNA  
  
30 <213> Primer  
  
  
35 <400> 20  
gtaaggatct gagctacaca t 21  
  
<210> 21  
<211> 22  
<212> DNA  
  
40 <213> Primer  
  
  
45 <400> 21  
atggataccg agtttctccg aa 22  
  
50 <210> 22  
<211> 21  
<212> DNA  
  
55 <213> Primer  
  
  
60 <400> 22  
aactggaaatt gcatctccgg a 21

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/07590

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N9/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**BIOSIS, WPI Data, SEQUENCE SEARCH, EMBL, EPO-Internal**

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FUKUCHI-MIZUTANI MASAKO ET AL: "Microsomal electron transfer in higher plants: Cloning and heterologous expression of NADH-cytochrome b5 reductase from <i>Arabidopsis</i> " PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), vol. 119, no. 1, January 1999 (1999-01), pages 353-361, XP002258118 ISSN: 0032-0889 cited in the application page 354, left-hand column, paragraph 2 -page 355, left-hand column, paragraph 3; figure 1 Y page 358, right-hand column, last paragraph -page 360, left-hand column, paragraph 2 ----- -/-	2-7, 15
Y	-----	1-16

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 October 2003

Date of mailing of the international search report

10/11/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Steffen, P

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 03/07590
-------------------------------------------------

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BAGNARESI PAOLO ET AL: "Tonoplast subcellular localization of maize cytochrome b5 reductases" PLANT JOURNAL, vol. 24, no. 5, December 2000 (2000-12), pages 645-654, XP002258119 ISSN: 0960-7412 page 652, left-hand column, paragraph 2 -right-hand column, paragraph 2; figure 1 Y page 649, right-hand column, last paragraph -page 652, left-hand column, paragraph 1 ---	2-7, 15
Y	page 649, right-hand column, last paragraph -page 652, left-hand column, paragraph 1 ---	1-16
X	BAGNARESI PAOLO ET AL: "Cloning and characterization of a maize cytochrome-b5 reductase with Fe3+-chelate reduction capability" BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 338, no. 2, 1 March 1999 (1999-03-01), pages 499-505, XP002258120 ISSN: 0264-6021 page 500; figure 1 Y page 504 ---	2-7, 15
Y	WO 01 38484 A (BASF PLANT SCIENCE GMBH) 31 May 2001 (2001-05-31) Cytochrom b5 Reduktase 25_ppprot1_046_e01 figures 2,18,34; example 19 ---	1-16
A	SAKURADANI EIJI ET AL: "Identification of an NADH-cytochrome b5 reductase gene from an arachidonic acid-producing fungus, Mortierella alpina 1S-4, by sequencing of the encoding cDNA and heterologous expression in a fungus, Aspergillus oryzae" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 65, no. 9, September 1999 (1999-09), pages 3873-3879, XP002258121 ISSN: 0099-2240 the whole document ---	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International Application No.

PCT/EP/07590

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: **17-25** because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

**See supplemental sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210**

3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**  

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

## Continuation of Box I, 2

## Claims 17-25

The current claims 17-25 relate to products, the use thereof and methods characterized by an unclear parameter or an unclear property, namely compounds or substances having a herbicidal or growth-regulating effect, characterized in that they are identified via a particular method. No structural features are provided for these compounds or substances. The use of this parameter in the current context gives rise to a lack of clarity within the meaning of PCT Article 6. In fact, it is impossible to compare such a parameter with the prior art disclosure. The lack of clarity is such that it is impossible to carry out a complete, meaningful search. This also applies to method claims 22-24, the aim of which is to produce products which are resistant to the above-mentioned compounds or substances. Although the method steps may be clear, the method itself contains many variants and the desired result (resistance to an unknown substance) cannot be compared with the prior art. The same applies to claim 25.

Moreover, the claims contain all products displaying the abovementioned property although the description does not actually disclose these products, contrary to the provisions of PCT Article 5. In the present case, the claims lack the necessary support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it is impossible to carry out a meaningful search.

Therefore no search has been carried out for the disclosure of claims 17 to 25.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 03/07590

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0138484	A	31-05-2001	WO 0138541 A1	31-05-2001
			AU 1499601 A	04-06-2001
			AU 1704501 A	04-06-2001
			BR 0015905 A	06-08-2002
			CA 2392475 A1	31-05-2001
			WO 0138484 A2	31-05-2001
			EP 1282713 A2	12-02-2003
			JP 2003518369 T	10-06-2003

# **INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 03/07590

A. KLASSEFIZIERUNG DES ANMELDUNGS-EVENTSTANDES  
IPK 7 C12N9/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

**Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole )**  
**IPK 7 C12N**

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, WPI Data, SEQUENCE SEARCH, EMBL, EPO-Internal

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FUKUCHI-MIZUTANI MASAKO ET AL: "Microsomal electron transfer in higher plants: Cloning and heterologous expression of NADH-cytochrome b5 reductase from Arabidopsis" PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), Bd. 119, Nr. 1, Januar 1999 (1999-01), Seiten 353-361, XP002258118 ISSN: 0032-0889 in der Anmeldung erwähnt Seite 354, linke Spalte, Absatz 2 -Seite 355, linke Spalte, Absatz 3; Abbildung 1 Seite 358, rechte Spalte, letzter Absatz -Seite 360, linke Spalte, Absatz 2 ---	2-7, 15
Y		1-16

**X** Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
  - A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
  - E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
  - L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
  - O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Aussstellung oder andere Maßnahmen bezieht
  - P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
  - T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
  - X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
  - Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
  - &\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche  16. Oktober 2003	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts  10/11/2003
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Steffen, P

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/07590

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGEGENNE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BAGNARESI PAOLO ET AL: "Tonoplast subcellular localization of maize cytochrome b5 reductases" PLANT JOURNAL, Bd. 24, Nr. 5, Dezember 2000 (2000-12), Seiten 645-654, XP002258119 ISSN: 0960-7412 Seite 652, linke Spalte, Absatz 2 -rechte Spalte, Absatz 2; Abbildung 1 Seite 649, rechte Spalte, letzter Absatz -Seite 652, linke Spalte, Absatz 1 ----	2-7, 15
Y		1-16
X	BAGNARESI PAOLO ET AL: "Cloning and characterization of a maize cytochrome-b5 reductase with Fe <sup>3+</sup> -chelate reduction capability" BIOCHEMICAL JOURNAL, Bd. 338, Nr. 2, 1. März 1999 (1999-03-01), Seiten 499-505, XP002258120 ISSN: 0264-6021 Seite 500; Abbildung 1 Seite 504 ----	2-7, 15
Y	WO 01 38484 A (BASF PLANT SCIENCE GMBH) 31. Mai 2001 (2001-05-31) Cytochrom b5 Reduktase 25_ppprot1_046_e01 Abbildungen 2,18,34; Beispiel 19 ----	1-16
A	SAKURADANI EIJI ET AL: "Identification of an NADH-cytochrome b5 reductase gene from an arachidonic acid-producing fungus, Mortierella alpina 1S-4, by sequencing of the encoding cDNA and heterologous expression in a fungus, Aspergillus oryzae" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 65, Nr. 9, September 1999 (1999-09), Seiten 3873-3879, XP002258121 ISSN: 0099-2240 das ganze Dokument -----	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 03/07590

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2.  Ansprüche Nr. 17-25 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3.  Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

### Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

## Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 17-25

Die vorliegenden Ansprüche 17-25 beziehen sich auf Produkte, Verwendung davon und Methoden die durch einen unklaren Parameter oder eine unklare Eigenschaft gekennzeichnet sind, nämlich Verbindungen/Substanzen mit herbizider oder wachstumsregulatorischer Wirkung dadurch gekennzeichnet, daß sie über ein bestimmtes Verfahren identifiziert wurden. Strukturelle Merkmale werden nicht für diese Verbindungen/Substanzen angegeben. Die Verwendung dieses Parameters im vorliegenden Kontext führt zu mangelnder Klarheit im Sinne von Artikel 6 PCT. Es ist in der Tat unmöglich den so gewählten Parameter mit dem Inhalt des Standes der Technik zu vergleichen. Der Mangel an Klarheit ist derart, daß eine komplette sinnvolle Recherche unmöglich ist. Dies gilt auch für die Verfahrensansprüche 22-24 die als Zielseitung Produkte haben die resistent gegen die oben genannten Verbindungen/Substanzen sind. In der Tat mögen die einzelnen Verfahrensschritte noch so klar sein, das Verfahren selbst jedoch beinhaltet viele Varianten und das gewünschte Resultat (Resistenz gegenüber einer unbekannten Substanz) läßt sich nicht mit dem Stand der Technik vergleichen. Gleiches gilt für Anspruch 25 zu beachten.

Darüber hinaus beinhalten die Ansprüche alle Produkte welche die oben genannte Eigenschaft aufweisen ohne, daß die Beschreibung auch solche Produkte tatsächlich offenbart im Gegensatz zu den Bestimmungen des Artikels 5 PCT. Im vorliegenden Fall sind die Ansprüche nicht genügend gestützt und die Anmeldung ist in dem Maß so unzureichend offenbart, daß eine sinnvolle Recherche unmöglich ist.

In Konsequenz wurde keine Recherche für den Inhalt der Ansprüche 17-25 durchgeführt.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/07590

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 0138484	A 31-05-2001	WO	0138541 A1	31-05-2001
		AU	1499601 A	04-06-2001
		AU	1704501 A	04-06-2001
		BR	0015905 A	06-08-2002
		CA	2392475 A1	31-05-2001
		WO	0138484 A2	31-05-2001
		EP	1282713 A2	12-02-2003
		JP	2003518369 T	10-06-2003